

Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Medicina

Departamento de Cirugía



Tesis Doctoral

***Regeneración ósea en defectos de tamaño crítico de
cráneo de rata con matriz ósea desmineralizada.***

***Estudio estereológico, histológico y radiológico mediante tomografía
de haz cónico.***

Directores: Dr. Miguel Burgueño García

Dr. Javier Arias Gallo

José María López-Arcas Calleja

Madrid, 2017

A mi mujer Beatriz.
A su lado, todo es más fácil.

A mis padres José M^a y M^a Lourdes, por su
dedicación y estímulo constante

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Miguel Burgueño García, Jefe De Servicio de Cirugía Maxilofacial Hospital Universitario La Paz, Profesor Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Tutor y co-director de mi Tesis, por su apoyo y enseñanzas. Al Dr. Javier Arias Gallo, Cirujano Maxilofacial en Hospital Ruber, co-director de mi Tesis, por su inestimable ayuda para la realización del proyecto en todas las fases de desarrollo del mismo.

A la Dra. Alejandra Caminoa, Médico Adjunto de Anatomía Patológica del Hospital de Guadalajara, por su asesoramiento en el estudio histológico de las muestras.

A la Dra. M^a José Morán Soto, Médico Adjunto de Cirugía Maxilofacial del Hospital Universitario La Paz, por su ayuda fundamental en la realización de los estudios radiológicos en el centro ICAT Madrid.

A todo el personal del laboratorio de Cirugía Experimental, en especial a Pablo y a la Dra. Carlota Largo, por su cercanía, sugerencias e inestimable ayuda en el manejo de los animales.

A mis hermanos, Pablo y Alberto. Por su apoyo y ayuda en la revisión del manuscrito.

A Dña. Silvia Galán Casanova por su ayuda en la edición y revisión del manuscrito.

Al Dr. Juan Miguel Antón Santos, Coordinador del S^o de Urgencias del hospital de Fuenlabrada por su ayuda en el análisis e interpretación de los datos estadísticos.

Al Dr. Tomás Yu, Médico-Odontólogo, por su apoyo y estímulo constante para la consecución de este proyecto.

A todos aquellos que con su actitud o aportación en algún momento han contribuido a la realización de este trabajo.

ÍNDICE

<u>JUSTIFICACIÓN</u>	pág.9
<u>INTRODUCCIÓN</u>	pág.13
1. ANATOMÍA ÓSEA	pág.13
1.1. ESTRUCTURA MACROSCÓPICA	pág.15
1.2. ESTRUCTURA MICROSCÓPICA	pág.15
1.2.1. Hueso compacto	pág.15
1.2.2. Hueso esponjoso	pág.18
1.2.3. Periostio	pág.19
1.2.4. Endostio	pág.20
1.2.5. Peculiaridades anatómicas de la rata	pág.21
2. COMPOSICIÓN DEL HUESO	pág.21
2.1. MATRIZ ÓSEA	pág.21
2.1.1. Sustancia Fundamental (Proteínas No Colágenas)	
2.1.1.1. Proteoglicanos	pág.22
2.1.1.2. Osteocalcina o BGP	pág.22
2.1.1.3. Osteopontina, Sialoproteína ósea y osteonectina	pág.23
2.1.2. Colágeno	pág.24
2.1.3. Mineral Óseo	pág.26
2.2. COMPONENTE CELULAR DEL TEJIDO ÓSEO	pág.29
2.2.1. Células osteoprogenitoras	pág.29
2.2.2. Osteoblastos	pág.30
2.2.2.1. Células madres mesenquimales y diferenciación osteoblástica	pág.33
2.2.2.2. Control del desarrollo osteoblástico	pág.34
2.2.3. Osteocitos	pág.37
2.2.4. Células de recubrimiento óseo (osteocitos de superficie)	pág.41
2.2.5. Osteoclastos	pág.41
3. OSIFICACIÓN U OSTEOGENÉISIS	pág.45
3.1. OSIFICACIÓN MEMBRANOSA	pág.45
3.2. OSIFICACIÓN ENDOCONDRALE	pág.48
3.3. PROCESO DE REGENERACIÓN ÓSEA EN FRACTURAS	pág.52
3.3.1. Fase de Reparación	pág.56
3.3.1.1. Reparación de las fracturas de origen endocondral	pág.60
3.3.1.2. Reparación de las fracturas de origen membranoso	pág.61
3.3.2. Fase de Remodelación	pág. 61
4. FACTORES DE CRECIMIENTO UTILIZADOS EN REGENERACIÓN ÓSEA	pág. 65
4.1. GENERALIDADES	pág.66

4.2. FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE BETA (TGF- β)	pág.69
4.2.1. Generalidades	pág.69
4.2.2. Utilización en cirugía esquelética reconstructiva	pág.74
4.3. PROTEÍNAS ÓSEAS MORFOGENÉTICAS (BMPS)	pág.76
4.3.1. Generalidades	pág.76
4.3.2. Utilización en cirugía esquelética reconstructiva	pág.80
5. MATRIZ ÓSEA DESMINERALIZADA (DBM)	pág.83
5.1. OSTEOINDUCCIÓN	pág.85
5.2. ANTECEDENTES HISTÓRICOS	pág.85
5.3. OBTENCIÓN DE MATRIZ ÓSEA DESMINERALIZADA	pág.92
5.4. UTILIZACIÓN CLÍNICA DE LA MATRIZ ÓSEA DESMINERALIZADA	pág.97
5.5. DBX®	pág.103
5.6. COLLOSS E®	pág.106
6. SUTITUTOS DE INJERTO ÓSEO OSTEOCONDUCTIVOS	pág.107
6.1. OSTEOCONDUCCIÓN	pág.107
6.2. ALOINJERTO	pág.108
6.3. SUSTITUTOS ÓSEOS SINTÉTICOS	pág.110
6.4. XENOINJERTO: BIO-OSS®	pág.111
7. MODELOS EXPERIMENTALES DE REGENERACIÓN ÓSEA	pág.114
7.1. DEFECTOS ÓSEOS EXPERIMENTALES DELIMITADOS	pág.118
7.2. ELECCIÓN DEL ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN	pág.120
7.3. LOCALIZACIÓN DEL DEFECTO ÓSEO	pág.123
7.3.1. Defectos segmentarios	pág.124
7.3.2. Defectos no segmentarios	pág.125
7.3.3. Presencia de periostio	pág.126
7.3.4. Defectos craneales	pág.127
7.3.5. Anatomía de la bóveda craneal de la rata	pág.128
7.4. REGENERACIÓN DE LOS DEFECTOS CRANEALES EN LA RATA	pág.128
8. TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE MUESTRAS	pág.130
8.1. MÉTODOS HISTOLÓGICOS	pág.131
8.1.1. Histomorfometría	pág.132
8.1.2. Estereología	pág.135
8.2. MÉTODOS RADIOLÓGICOS	pág.145
8.2.1. Micro-CT	pág.146
8.2.2. Tomografía de haz cónico (CBCT)	pág.148
<u>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</u>	pág.154

<u>MATERIAL Y MÉTODO</u>	pág.157
1. CONSIDERACIONES GENERALES	pág.158
2. EL MODELO EXPERIMENTAL	pág.158
2.1. ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN	pág.158
2.2. NUTRICIÓN Y CUIDADOS	pág.160
2.3. NÚMERO DE ANIMALES EMPLEADOS Y DISTRIBUCIÓN DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO	pág.161
2.3.1. Grupo Técnica Quirúrgica	pág.162
2.3.2. Grupos Experimentales	pág.162
2.4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	pág.163
2.4.1. Material de Investigación	pág.163
2.4.2. Material para la Intervención quirúrgica	pág.164
2.4.3. Material para el procesamiento de las muestras	pág.165
2.4.4. Material para la histología y la estereología	pág.165
2.4.5. Equipo Radiológico	pág.166
2.4.6. Ordenador, programas informáticos, cámara fotográfica	pág.166
2.4.7. Procedimiento quirúrgico	pág.166
2.5. SACRIFICIO DEL ANIMAL	pág.177
2.6. TÉCNICAS HISTOLÓGICAS	pág.178
2.6.1. Preparación del bloque de tejido	pág.178
2.6.2. Fijación y descalcificación	pág.179
2.6.3. Tallado y preparación de los bloques de parafina	pág.179
2.6.4. Cortes seriados	pág.180
2.6.5. Tinciones	pág.180
2.6.6. Análisis histológico	pág.181
2.6.7. Estimación de volúmenes por el método de cavalieri	pág.181
2.6.7.1. <i>Criterios para los impactos</i>	pág.182
2.6.7.2. <i>Estimación del volumen de los compartimentos de interés</i>	pág.183
2.7. TÉCNICAS RADIOLÓGICAS	pág.185
2.7.1. Especificaciones Técnicas del sistema ICAT de CBCT	pág.186
2.7.2. Análisis y procesado de los Datos Radiológicos	pág.187
2.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	pág.188
<u>RESULTADOS</u>	pág.193

1. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	pág.194
1.1. GRUPO TÉCNICA QUIRÚRGICA	pág.194
1.2. GRUPOS EXPERIMENTALES	pág.195
2. RESULTADOS TÉCNICAS RADIOLÓGICAS	pág.196
2.1. ANÁLISIS RADIOLÓGICO CUALITATIVO	pág.196
2.2. ANÁLISIS RADIOLÓGICO CUANTITATIVO	pág.204
2.2.1. Estadística Descriptiva	pág.205
2.2.2. Comparación Volumen Óseo Regenerado Intergrupar (CBCT)	pág.207
2.2.3. Comparación Volumen Óseo Regenerado Intragrupal: DBX y Collos Lote 1 y Lote 2 (CBCT)	pág.209
2.2.3.1. Comparación Intragrupal Colloss: Lote 1 y Lote 2	pág.209
2.2.3.2. Comparación Intragrupal DBX: Lote 1 y Lote 2	pág.210
3. RESULTADOS TÉCNICAS HISTOLÓGICAS	pág.212
3.1. ANÁLISIS HISTOLÓGICO CUALITATIVO	pág.212
3.1.1. Consideraciones Generales	pág.212
3.1.2. Grupo Control	pág.214
3.1.3. Grupo DBX	pág.216
3.1.4. Grupo Colloss	pág.219
3.1.5. Grupo Bio-Oss	pág.221
3.2. ANÁLISIS HISTOLÓGICO CUANTITATIVO	pág.223
3.2.1. Estadística Descriptiva	pág.225
3.2.2. Cálculo del CV^2 vs CE^2 (Validación Análisis Estereológico de Cavalieri)	pág.230
3.2.3. Comparación Volumen Óseo Regenerado Intergrupar (Cavalieri)	pág.232
3.2.4. Comparación Intragrupal DBX y Collos: lotes 1 y 2 (Cavalieri)	pág.232
3.2.4.1. Comparación Intragrupal Collos: Lote 1 y Lote 2 (Cavalieri)	pág.233
3.2.4.2. Comparación Intragrupal DBX: Lote 1 y Lote 2 (Cavalieri)	pág.234
4. ANÁLISIS DE CORRELACIÓN CAVALIERI VS CBCT	pág.234

DISCUSIÓN

1. MODELO EXPERIMENTAL	pág.240
1.1. ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN	pág.240
1.2. DEFECTOS DE TAMAÑO CRÍTICO DE RATA	pág.243
2. MATERIALES DE INVESTIGACIÓN UTILIZADOS	pág.248
2.1. DBX®	pág.248
2.2. COLLOSS-E®	pág.252
2.3. BIO-OSS®	pág.253

3. ELECCIÓN DE LA TÉCNICA DE EVALUACIÓN	pág.253
3.1. TÉCNICA RADIOLÓGICA (CBCT)	pág.257
3.2. TÉCNICA HISTOLÓGICA (MÉTODO DE CAVALIERI)	pág.264
3.2.1. Procesado de las muestras	pág.264
3.2.2. Estudio Estereológico	pág.267
 <u>CONCLUSIONES</u>	 pág.270
 <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	 pág.272

JUSTIFICACIÓN

La enorme capacidad de regeneración espontánea del hueso tras una lesión, a diferencia de otros tejidos del organismo (el tejido nervioso como ejemplo paradigmático), que nosotros podemos modelar guiar o potenciar, hace que sea tan atractivo para la cirugía reconstructiva. Esto es, con las condiciones adecuadas podemos llegar a regenerar en su totalidad desde un punto de vista anatómico y funcional las estructuras óseas dañadas o perdidas, lo que constituye el objetivo último de cualquier técnica reconstructiva.

No obstante, en muchas ocasiones, esta capacidad de regeneración espontánea del hueso resulta insuficiente, bien porque las necesidades regenerativas exceden las capacidades de una persona sana (por ejemplo un defecto óseo de gran tamaño), o bien por la existencia de alteraciones patológicas (osteoporosis por citar alguna de ellas) que afectan a la capacidad ósea regenerativa. Estas alteraciones del proceso de regeneración ósea se traducen en: ausencia de consolidación de fracturas, incapacidad del material protésico para osteointegrarse y atrofia ósea generalizada o localizada.

Las principales técnicas óseas reconstructivas se basan en el autoinjerto de hueso del propio paciente, obtenido de diferentes localizaciones como la calota craneal, la cresta iliaca, el hueso mandibular, etc. La elección de la zona donante así como la forma en que éste sea recolectado (bloques, láminas, partículas, etc.) va a depender en gran medida del defecto óseo que se debe regenerar. Así, en el ámbito de la Cirugía Ortopédica la zona donante por excelencia es la cresta iliaca, en contraposición con la Cirugía Maxilofacial donde la utilización de la calota craneal como zona donante está levemente por encima de la anterior.

En conjunto todas estas técnicas constituyen el patrón oro o “gold standar” en regeneración ósea. No obstante, no están exentas de complicaciones. Por un lado, la calidad de estos injertos autólogos depende en gran medida del estado de salud del paciente. De hecho, con frecuencia aquellos pacientes que suelen precisar un injerto de la máxima calidad (por ejemplo diabéticos, fumadores o pacientes con osteoporosis) son aquellos que presentan una peor calidad del mismo.

Además hay otras desventajas respecto a la utilización de injertos óseos autólogos que es importante considerar en la práctica clínica. La principal, es la frecuente necesidad de utilizar una zona donante diferente a la receptora, lo que aumenta la morbilidad, prolonga el tiempo operatorio y alarga la estancia hospitalaria. Por otro lado, la remodelación fisiológica del hueso conduce a una reabsorción postoperatoria del injerto que en general es variable y poco predecible.

Por todo ello, en los últimos años el estudio de la regeneración ósea ha tratado de determinar qué factores biológicos o técnicas quirúrgicas son capaces de promover una regeneración tisular ósea completa y fidedigna en estructura y función, en el menor tiempo y con la menor morbilidad posible al paciente.

Los materiales más extensamente estudiados en las últimas décadas son el hueso heterólogo, los xenoinjertos óseos, y los materiales sintéticos (hidroxiapatita sólida o en cementos y fosfato tricálcico fundamentalmente). Éstos actúan como matrices cuya principal función es la de guiar pasivamente o incluso en algunos casos conducir la migración de las células óseas desembocando en última instancia en la regeneración del defecto óseo. Desgraciadamente, estos materiales presentan un mayor riesgo de infección en comparación con los injertos autólogos y su capacidad para integrarse en el organismo del hospedador es variable.

Esta falta de predictibilidad en los resultados que se obtienen con este tipo de “matrices pasivas” ha estimulado la apertura de nuevas vías de investigación en el campo de la regeneración tisular destinadas a estimular las propias células responsables de la regeneración ósea. Estas técnicas de ingeniería tisular ósea se fundamentan en tres pilares: matrices osteoconductoras, moléculas de señalización y células.

En este sentido, en los últimos años se han desarrollado comercialmente diversos compuestos, denominados genéricamente, Matriz Ósea Desmineralizada (en adelante DBM) que se basan en la obtención de concentrados de hueso diafisario, desmineralizado y liofilizado. Teóricamente, dichas matrices desmineralizadas tienen el potencial de inducir la formación de hueso (osteoinducción) *de novo*, gracias a ciertas capacidades osteoconductoras y fundamentalmente a la presencia en su composición de cantidades variables de diversos Factores de Crecimiento (moléculas de señalización).

Lamentablemente, aunque en la actualidad se hallan comercializadas diversas DBM, existe escasa validación científica sobre la eficacia real de estos compuestos en términos de su capacidad regenerativa en el ámbito de la Cirugía Craneo-Maxilofacial.

Con tal fin, mediante la realización del presente proyecto de investigación se ha pretendido estudiar la eficacia real de DBX® y COLLOSS-E®, matrices óseas desmineralizadas comercialmente disponibles para su utilización en humanos, en un modelo estandarizado de regeneración ósea en defectos de tamaño crítico del cráneo de rata.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. ANATOMÍA ÓSEA

El hueso como los restantes tejidos conjuntivos está formado por células, fibras y sustancia fundamental, pero a diferencia de los otros, sus componentes extracelulares están calcificados y le convierten en un material duro y firme, adecuado para su función de soporte y protección¹.

1.1 ESTRUCTURA MACROSCÓPICA

Existen dos formas de hueso que se pueden identificar a simple vista: el **compacto** (sustancia compacta) y el **esponjoso o reticulado** (sustancia esponjosa). Éste último está constituido por un retículo tridimensional de espículas óseas ramificadas o de trabéculas que delimitan un sistema laberíntico de espacios intercomunicados, ocupados por la médula ósea. El hueso compacto aparece como una masa sólida continua, en la cual sólo se ven espacios con la ayuda de un microscopio.

En los huesos largos típicos, tales como el fémur o el húmero, podemos distinguir dos zonas anatómicas diferenciadas: las **epífisis** o extremos y la **diáfisis** o porción central, formada por un cilindro de pared gruesa hecha de hueso compacto, con una cavidad medular central ósea. Las **epífisis** de los huesos largos están formados fundamentalmente por hueso esponjoso recubierto por una corteza delgada de hueso compacto. En el adulto, los espacios intercomunicados que hay entre las trabéculas del hueso esponjoso se continúan directamente con la cavidad medular de la diáfisis¹.

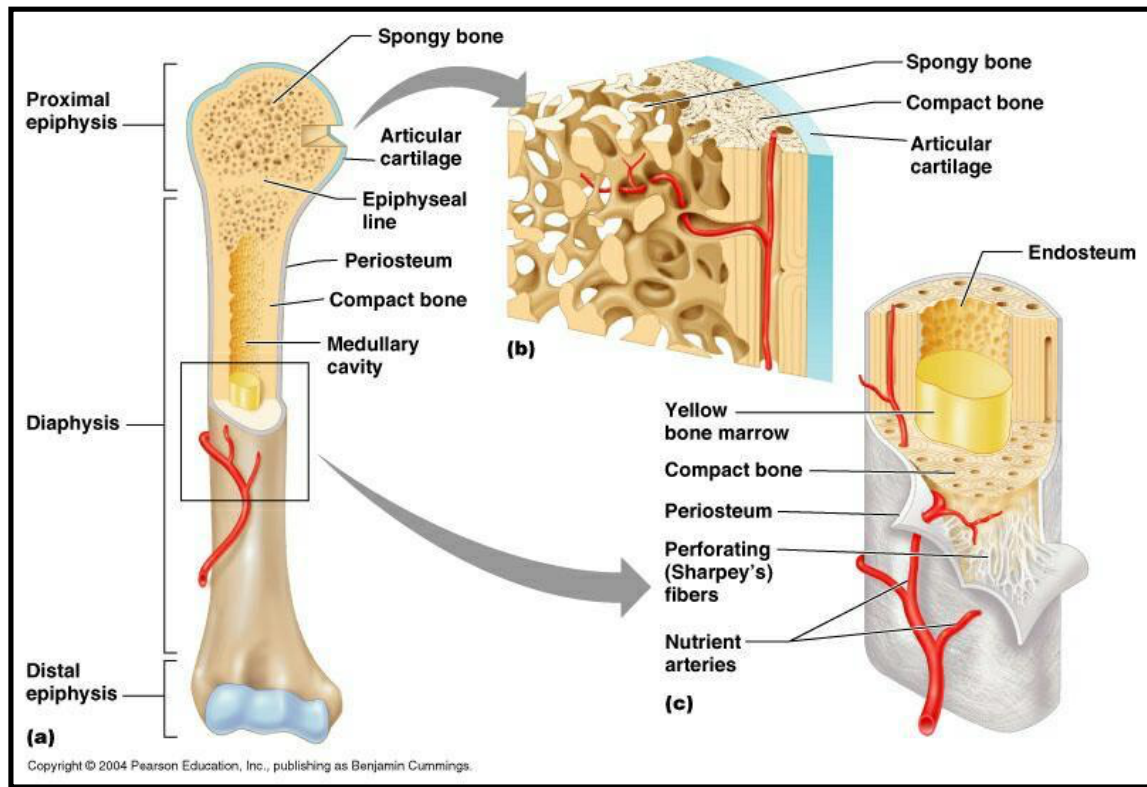


FIGURA 1. Representación esquemática del hueso diafisario donde se aprecian las diferentes estructuras macroscópicas del hueso: hueso compacto (Compact bone); hueso esponjoso (Spongy Bone), periostio (Periosteum); endostio (Endosteum).

Adaptado de: http://www.personal.psu.edu/sta/_m/b/mbt102/bisci4online/bone/bonestruc.

A diferencia del adulto, en el individuo en crecimiento las **epífisis**, nacen de centros de osificación independientes y están separados de la diáfisis por la placa epifisaria cartilaginosa que se une a ésta gracias a unas columnas de hueso esponjoso de la región intermedia llamada **metáfisis**. El **cartílago epifisario** y el hueso esponjoso colindante de la metáfisis constituyen una zona de crecimiento, en la cual tiene lugar todo el crecimiento en longitud del hueso joven.

En general, los huesos están recubiertos por el **periostio**, una capa de tejido conjuntivo especializado, dotada de potencial osteogénico. Está ausente en aquellas áreas de los huesos largos que están recubiertas por cartílago articular, así como en las inserciones de los ligamentos y tendones. La cavidad medular de la diáfisis y las cavidades del hueso esponjoso están revestidas por el **endostio**, una fina capa celular que también posee capacidad osteogénica.

1.2 ESTRUCTURA MICROSCÓPICA

1.2.1 Hueso Compacto

Está formado fundamentalmente por una sustancia intersticial mineralizada, denominada **matriz ósea**, depositada en capas o laminillas de 3 a 7 μm de grosor. Espaciadas de un modo bastante regular por esta sustancia intersticial del hueso existen cavidades lenticulares, llamadas **lagunas**, cada una de las cuales está ocupada por una célula del hueso, el **osteocito**. Desde cada laguna irradian en todas direcciones los canalículos, unos conductillos sumamente delgados y ramificados que penetran en la sustancia intersticial de las laminillas y se anastomosan con los canalículos de las lagunas vecinas. Constituyen así un sistema entrelazado de canales que conectan las numerosas lagunas óseas y que son además esenciales para la nutrición de las células óseas (Figura 3).

Las laminillas de hueso compacto se disponen de tres formas:

1. Como **sistemas de Havers** (osteonas corticales): es la disposición más frecuente. Son estructuras tubulares centradas en un vaso sanguíneo, con aproximadamente 4 a 20 laminillas óseas dispuestas concéntricamente a su alrededor. En promedio miden unos 50 μm de diámetro y cada conducto contiene además de uno o dos capilares, vasos linfáticos, fibras nerviosas y tejido conectivo. Las láminas se componen, en su mayor parte, de fibras de colágeno que transcurren en paralelo en cada lámina, pero con diferente dirección de fibras para láminas vecinas. En un corte transversal, los sistemas haversianos aparecen como anillos concéntricos en torno a un orificio central. En un corte longitudinal, se ven como bandas situadas unas al lado de otras y paralelas a los canales vasculares. Cada osteona cortical forma un cilindro

longitudinal de unos 150 μm de diámetro y 3.000 μm de longitud. En los huesos largos los sistemas haversianos suelen disponerse linealmente paralelos al eje mayor del hueso, pero pueden también orientarse oblicuamente o curvarse.

2. Como **sistemas intersticiales**: zonas irregulares de tejido óseo laminar que se disponen en los intersticios entre los sistemas de Havers y que son en realidad restos de osteonas degradadas. Los sistemas haversianos y los sistemas intersticiales están separados entre sí por las **líneas de cemento** que sólo contienen escasas fibras de colágeno no calcificadas.
3. Como **laminillas circunferenciales internas y externas** (láminas basales interna y externa): se localizan respectivamente en la superficie externa de la cortical, justo por debajo del periostio, y en la superficie interna, por debajo del endostio. Se disponen ininterrumpidamente (excepto para permitir el paso de los vasos sanguíneos) rodeando todo el hueso, y tapizándolo tanto por la superficie externa (perióstica) como interna (endóstica).

En el hueso compacto se distinguen dos categorías de canales vasculares. Los canales longitudinales que ocupan el centro de los sistemas haversianos se llaman **canales haversianos**. Tienen de 22 a 110 μm de diámetro y contienen uno o dos vasos sanguíneos, rodeados de una vaina de tejido conjuntivo laxo. Los vasos son en su mayor parte, capilares y vénulas postcapilares, pero en ocasiones también pueden encontrarse arteriolas.

Los canales haversianos comunican unos con otros y con la superficie o con la cavidad medular por medio de unos canales transversales u oblicuos, denominados, **canales o conductos de Volkmann**. Atraviesan el tejido óseo en sentido casi transversal y no están rodeados de láminas ordenadas en forma concéntrica. Por medio de los conductos de

Volkman los vasos de los conductos de Havers se comunican con los vasos del periostio y del endostio respectivamente.

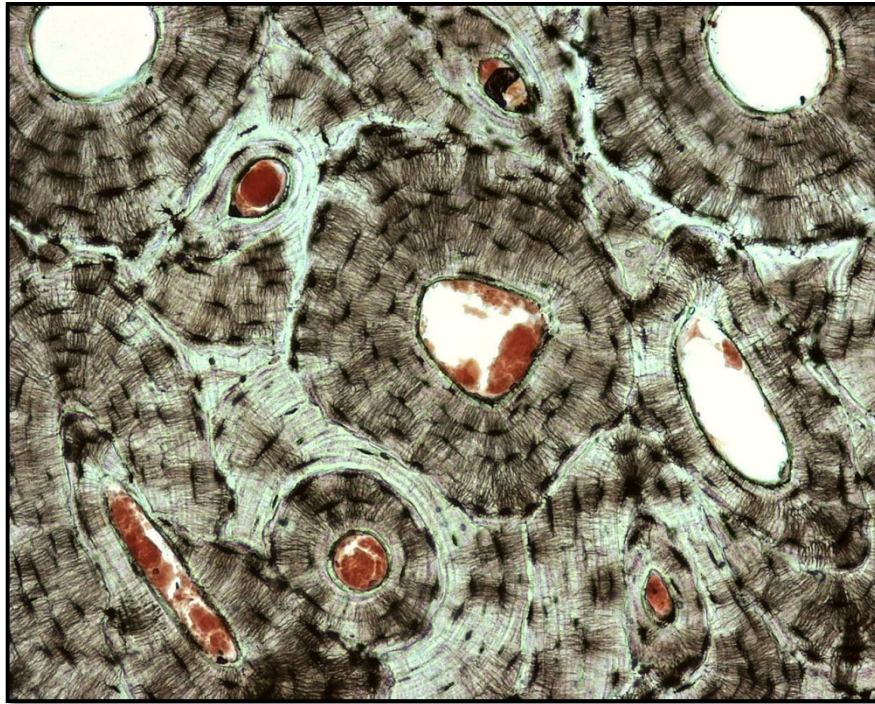


FIGURA 2. Estructura microscópica en corte transversal donde se observa la disposición de la osteona con laminillas circunferenciales en torno a un canal central así como las laminillas intersticiales. Adaptado de: <http://www.personal.psu.edu/sta/m/b/mbt102/bisci4online/bone/osteo>

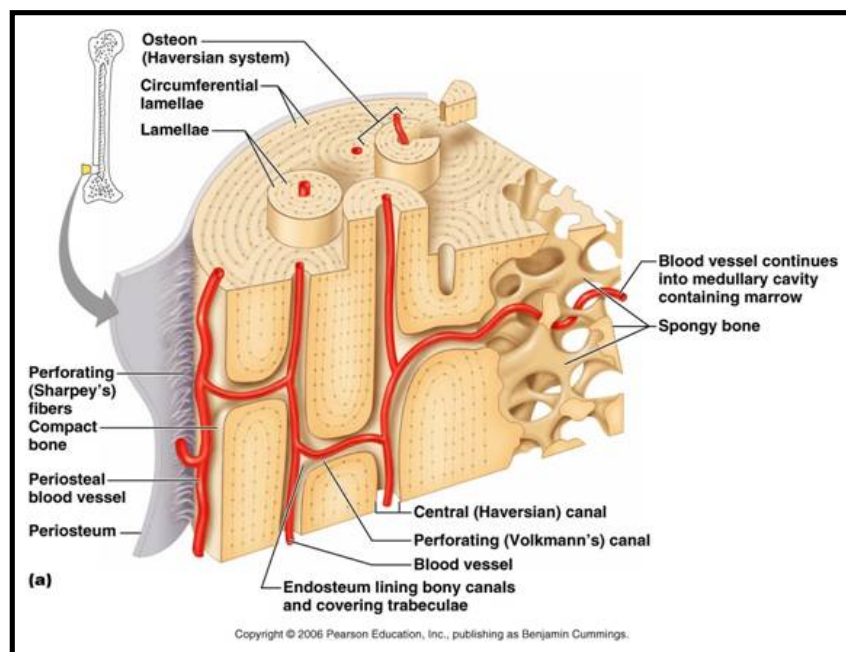


FIGURA 3. Representación esquemática de la disposición de los canales óseos vasculares: canales centrales (Haversianos) y canales perforantes transversales (Volkman). Adaptado de: <http://www.personal.psu.edu/sta/m/b/mbt102/bisci4online/bone/irrigation>

1.2.2 Hueso Esponjoso (Tejido Óseo Trabecular)

El tejido óseo trabecular también está compuesto por láminas, pero no forman sistemas de Havers, dado que no se observan conductos de Havers, de Volkmann ni vasos sanguíneos. El elemento básico estructural del tejido óseo trabecular es la osteona trabecular, que tiene la forma de un disco plano de unos 70 μm de espesor y una longitud promedio de 600 μm . El disco está formado por alrededor de 20 láminas de recorrido paralelo a la superficie del mismo.

El espesor de las trabéculas varía entre 10 y 400 μm .

En el tejido óseo que soporta peso en condiciones normales, por ejemplo las vértebras, las trabéculas son más gruesas en la dirección de la carga, por lo que son muy resistentes a la compresión. No así a la torsión debido a la presencia de trabéculas horizontales de menor espesor.

Las trabéculas más delgadas están compuestas por una única osteona trabecular, con ambas superficies ubicadas hacia el espacio medular recubiertas por endostio, mientras que las trabéculas más gruesas se componen de varias osteonas trabeculares separadas por líneas de cemento intermedias.

La nutrición de los osteocitos del tejido trabecular se obtiene por difusión a partir de la superficie endóstica a través de los diminutos canalículos comunicantes que interconectan las lagunas y que llegan hasta la superficie².

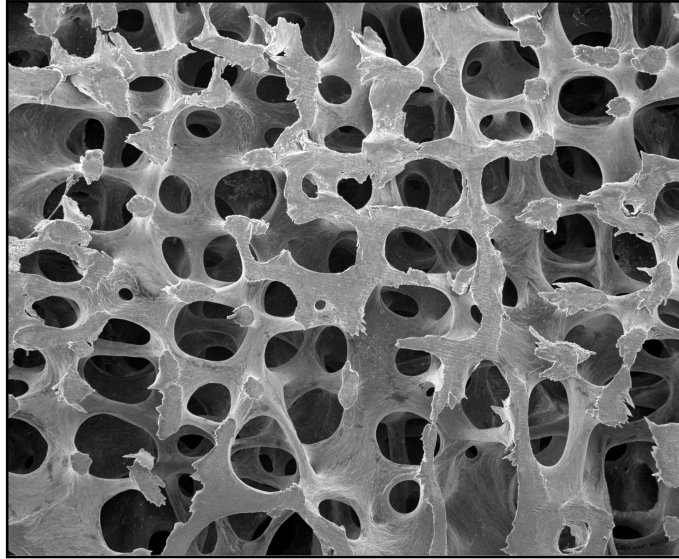


FIGURA 4. Imagen de microscopía electrónica de baja intensidad donde se aprecia la arquitectura trabecular del hueso de la tercera vértebra lumbar de una mujer de 30 años. (Cortesía de Tim Amett, University College Londo)

1.2.3 Periostio

Durante el periodo de crecimiento del hueso, el periostio se compone de una capa externa y una interna.

- La *capa interna* es un tejido conectivo laxo vascularizado, en el que se localizan células formadoras de hueso u osteoblastos en contacto directo con el hueso y sus precursores, las células osteoprogenitoras, inactivas desde el punto de vista osteogénico que, por su histología se asemejan a las células del tejido conectivo. Cuando finaliza el periodo de crecimiento, los osteoblastos se transforman en este tipo de células de recubrimiento óseo sin actividad osteogénica, que forman una capa plana sobre la superficie ósea. La porción profunda del periostio mantiene de esta forma el potencial osteogénico. Así, en caso de fractura ósea, las células osteoprogenitoras se diferencian a osteoblastos que forman nuevo tejido óseo durante la reparación de la fractura.

- La *capa externa* del periostio se compone de tejido conjuntivo denso relativamente acelular, que contiene vasos sanguíneos de gran tamaño que se ramifican. Algunas ramas de estos vasos atraviesan la capa profunda del periostio y entran en los canales de Volkman, a través de los cuales se comunican con los sistemas haversianos. Estos pequeños, pero numerosos vasos que penetran en los canales de Volkmann, contribuyen a mantener la fijación del periostio al hueso subyacente. Por otra parte, encontramos también haces gruesos de fibras colágenas de la capa externa del periostio, denominadas **fibras de Sharpey**, que penetran en las laminillas circunferenciales externas o en los sistemas intersticiales del hueso (Figura 3). Éstas fibras se originan durante el crecimiento del hueso al quedar atrapadas en la matriz ósea, haces colágenos durante la formación subperióstica de nuevas laminillas.
- Cuando las fibras perforantes permanecen sin calcificar, ocupan canales irregulares que penetran en el hueso compacto desde la superficie perióstica en una dirección perpendicular u oblicua a la laminilla. Cuando se calcifican, tienen el aspecto de estrías radiales irregulares de la porción más externa del hueso cortical. Sirven para anclar firmemente el periostio al hueso subyacente. Varían mucho en número y forma según las diferentes regiones, pero son particularmente numerosas en algunos huesos del cráneo y en las zonas de inserción de músculos y tendones en el periostio de los huesos largos⁴.

1.2.4 Endostio

Es mucho más fino que el periostio y se compone de una única capa de células planas de recubrimiento óseo, que cubren la todas las cavidades del hueso, incluidos los canales haversianos y los espacios medulares del hueso esponjoso. Remeda la capa externa del

estroma de la médula ósea en los sitios que entra en contacto con el hueso y al periostio por su capacidad osteogénica.

1.2.5 Peculiaridades anatómicas de la rata

La anatomía microscópica ósea de la rata difiere de la de los mamíferos superiores descrita anteriormente en que su hueso cortical carece de sistemas haversianos⁵⁻⁷. Para ser más precisos, en la rata no se produce en condiciones normales la remodelación intracortical por la que éstos se forman. Por tanto, las laminillas óseas en general se disponen circunferencialmente alrededor del eje mayor del hueso. Este hecho, como se verá más adelante, tiene sus excepciones dependiendo de las condiciones en las que tenga lugar la remodelación ósea

2. COMPOSICIÓN DEL HUESO

2.1 MATRIZ ÓSEA

La sustancia intersticial del hueso está compuesta por dos componentes principales, una matriz orgánica que representa el 35% de la misma y las sales inorgánicas que comprenden el 65% del peso en seco⁸.

La matriz orgánica está compuesta por fibras de colágeno incluidas en una sustancia fundamental rica en proteoglicanos. En adultos, el colágeno representa alrededor del 90% de la matriz orgánica, por lo que la matriz ósea es eosinófila.

Simplificando, podríamos decir que la dureza y la resistencia a la compresión se deben al contenido de sales inorgánicas, mientras que sus propiedades elásticas y resistencia a la tracción dependen del colágeno.

2.1.1 Sustancia Fundamental (Proteínas No Colágenas)

Los análisis bioquímicos de tejido óseo homogeneizado y fraccionado demuestran que el componente carbohidratado está formado por proteoglicanos, en especial por condroitín-sulfato y pequeñas cantidades de hialuronato⁹.

2.1.1.1 *Proteoglicanos*

Suponen menos del 10% de las proteínas no colágenas. Los más importantes son el **biglicán** y el **decorín**, no asociados a cristales minerales, y la **CS-PGIII**, asociada a los cristales minerales. Se les supone un papel en la regulación de factores de crecimiento, en la formación de fibrillas colágenas y en la mineralización ósea.

También podemos encontrar diversas moléculas de menor tamaño como: proteínas derivadas del suero (albúmina y α_2 -HS glucoproteínas), proteínas con ácido alfa-carboxiglutámico (GLA) (proteína GLA de la matriz y proteína GLA del hueso [osteocalcina]), osteonectina (una glicoproteína), osteopontina (una fosfoproteína), sialoproteínas, trombospondinas, y otras menos caracterizadas⁶ que desempeñan un papel importante en procesos tales como la mineralización. A continuación se detallan las características más relevantes de las proteínas del hueso no colágenas, a partir de las revisiones de Boskey⁸ y Sodek¹⁰.

2.1.1.2 *Osteocalcina o BGP*

Es la proteína no colágena más abundante en el tejido óseo adulto. Constituye el 10-20% de las proteínas no colágenas del hueso dependiendo de la edad y la especie, y cerca del 2% de las proteínas totales del mismo. Es un polipéptido de 49 residuos de aminoácidos y un peso molecular de 5000 dalton. Contiene tres residuos del aminoácido γ -carboxiglutámico (Gla) en las posiciones 17, 19 y 24 de su secuencia, que le confieren la capacidad de unirse al calcio, y de manera más específica a la hidroxapatita del hueso,

de manera que la mayor parte de la osteocalcina sintetizada por el osteoblasto permanece en el hueso. No obstante, parte de la osteocalcina sintetizada pasa al suero donde puede detectarse, para valorar la actividad metabólica ósea.

Comparte con el resto de proteínas γ -carboxiladas del organismo la dependencia de la vitamina K para su procesamiento. Aunque su función no está totalmente dilucidada, se sabe que la administración de antagonistas de la vitamina K provoca hipermineralización ósea. Esta proteína inhibe el crecimiento de los cristales de hidroxapatita, por los cuales tiene gran afinidad. También resulta quimiotáctica para los osteoclastos, por lo que podría desempeñar un papel en la reabsorción ósea.

La **osteocalcina** es específica del tejido óseo, y dado que su procedencia es específica del osteoblasto, sus niveles constituyen un marcador bioquímico, detectable en sangre, muy específico de actividad osteoblástica¹¹.

Se une a la hidroxapatita, por lo que es posible que también desempeñe un papel relevante en el proceso de calcificación. Finalmente, la producción de osteocalcina es estimulada por 1,25-dihidroxicolecalciferol (forma activa de la Vitamina D)

2.1.1.3 Osteopontina, sialoproteína ósea y osteonectina

Son proteínas fuertemente fosforiladas y glicosiladas, con gran cantidad de residuos de aminoácidos de carácter ácido (ácidos glutámico y aspártico). Se sintetizan durante la diferenciación osteoblástica y la mineralización ósea.

- **Sialoproteína ósea (BSP):** Implicada en la adhesión celular. Favorece la formación de cristales de hidroxapatita *in vitro* (es el nucleador de cristales más potente).

- **Osteopontina (OPN):** Implicada en la adhesión celular de osteoblastos y osteoclastos. Inhibe el crecimiento cristalino en solución. Parece que pueda estar

producida por las células madres mesenquimales (*MSCs*) en las primeras fases de su diferenciación osteoblástica.

- ***Osteonectina (ONN)***: Tiene una gran afinidad por los iones calcio y parece que actúa inhibiendo el crecimiento de los cristales de apatita, con mayor intensidad al inicio del proceso de mineralización. No obstante, al igual que sucede con osteopontina, no hay grandes alteraciones en los ratones transgénicos que carecen de estas proteínas. La fosfatasa alcalina, cuya elevación sérica es un indicador de aposición ósea, defosforila estas proteínas, inactivándolas.

- ***Fibronectina (FNN)***: Aunque no es exclusiva del hueso, está involucrada en la mineralización mediante la fijación de los cristales de hidroxiapatita.

2.1.2 Colágeno

El colágeno es el principal componente orgánico de la matriz ósea extracelular, constituye cerca del 90% de las proteínas óseas y es casi exclusivamente colágeno tipo I¹⁰⁻¹². La estructura molecular está compuesta por tres cadenas polipeptídicas, dos cadenas idénticas $\alpha 1$ y una cadena estructuralmente similar, pero genéticamente diferente, $\alpha 2$.

Sus fibras presentan un diámetro de 50 a 70 nm y muestran la típica estriación cruzada con una periodicidad de 67 nm. El colágeno óseo difiere ligeramente del colágeno de los tejidos blandos del mismo tipo debido a que posee un mayor número de enlaces cruzados intermoleculares, lo que le confiere mayor resistencia.

Es sintetizado en el interior de los osteoblastos como un precursor, el procolágeno tipo I, molécula que contiene en ambos extremos extensiones adicionales proteicas, la

extensión aminoterminal de aproximadamente 25.000 Da, y la extensión carboxilo terminal de 35.000 Da. La parte central de la molécula tiene aproximadamente 100.000 Da¹³.

Estas extensiones son denominadas respectivamente propéptido amino terminal del procolágeno tipo I (PINP) y propéptido carboxilo terminal del procolágeno tipo I (PICP). En el medio extracelular este precursor sufre el efecto de peptidasas específicas que separan los propéptidos respectivos de la molécula, liberándose tres proteínas. Una de ellas es la molécula de colágeno propiamente dicha, que se agregará formando fibras en la conformación de la matriz ósea.

Las otras dos moléculas son los propéptidos amino y carboxilo terminales del colágeno tipo I (PINP y PICP) que pueden ser detectadas en la circulación sanguínea. A medida que el procolágeno tipo I es procesado, se liberan cantidades estequiométricas de ambos propéptidos, PINP y PICP, en proporciones 1:1 con el colágeno formado, por lo que la concentración de estos propéptidos refleja la síntesis de colágeno tipo I. Si se tiene en cuenta que el 90% del colágeno tipo I corporal constituye la matriz orgánica del hueso, los niveles circulantes de ambos propéptidos se pueden considerar como un índice de actividad osteoblástica o formación ósea^{13,14}.

En el hueso laminar maduro, las fibras colágenas presentan una disposición muy ordenada. Las que están dentro de cada laminilla de un sistema haversiano son paralelas en su orientación, pero cambian la dirección de las fibras en las laminillas vecinas. Este cambio de orientación de las fibras es la causa de la alternancia de capas brillantes y oscuras cuando se analizan con el microscopio polarizado.

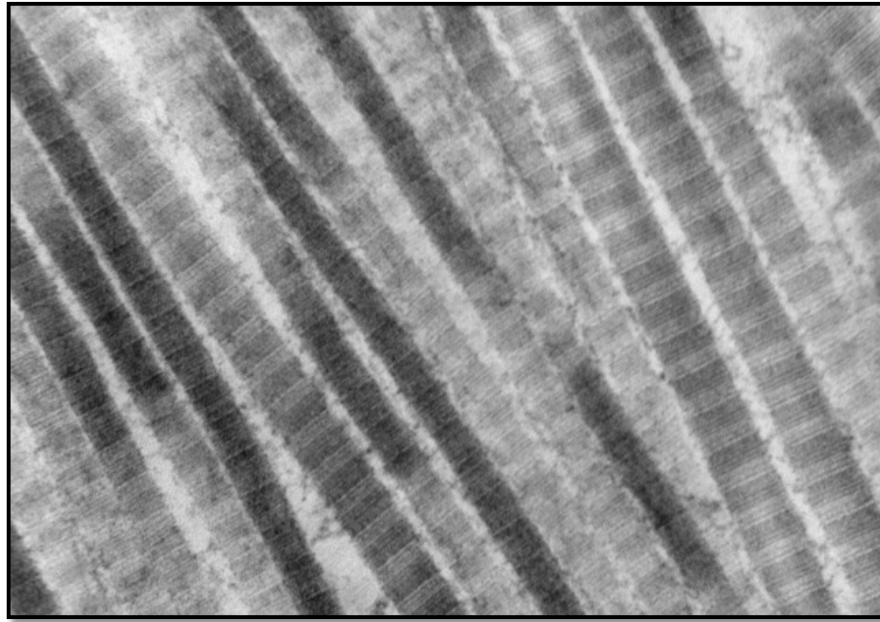


FIGURA 5. Imagen de Microscopio Electrónico donde se aprecian las estriaciones características debidas a la disposición de las fibras de Colágeno I (Cortesía de Tim Ammet. University College London).

2.1.3 Mineral Óseo

La sustancia inorgánica del hueso está formada por depósitos submicroscópicos de un tipo de fosfato cálcico, muy parecido pero no idéntico al mineral hidroxiapatita. Las apatitas son materiales organizados en cristales hexagonales o pseudo hexagonales que tienen la siguiente fórmula estequiométrica: $M_{10}(XO_4)Z_2$.

En la hidroxiapatita, que tiene una composición estequiométrica bastante similar al hueso, la fórmula es $Ca_{10}(PO_4)_6OH_2$. En el hueso, con mucha frecuencia el fosfato (PO_4^{3-}) es sustituido por el carbonato (CO_3^{2-}). Mientras que en la hidroxiapatita el ratio Ca:Pes de 5:3 (1,67) en el hueso mineral los ratios oscilan desde 1,37-1,87, como consecuencia de que la composición del hueso mineral es mucho más compleja y contiene iones adicionales como silicio, carbonato, fluor y zinc⁴. Éste se deposita inicialmente en forma de fosfato cálcico amorfo y más tarde se reordena para formar hidroxiapatita cristalina.

En su fase final, el fosfato cálcico está presente en forma de varillas delgadas de 1,5 a 3 nm de espesor y de aproximadamente 40 nm de largo. Están situados sobre y dentro de la sustancia de las fibras colágenas de la matriz. Los cristales no están distribuidos al azar sino que aparecen regularmente a intervalos de 60 a 70 nm, a lo largo de las fibras.

Esta disposición del mineral refleja la geometría subyacente de la trama molecular del colágeno. En el de tipo I, las moléculas se disponen de forma paralela, de manera que la distancia menor entre las mismas es de 67 nm. Esta disposición da lugar a una trama ordenada de huecos o aberturas de aproximadamente 40 nm de longitud y 2,5 nm de anchura en el interior de la sustancia de la fibra.

Los cristales de hidroxiapatita se alojan principalmente en estos huecos, aunque en el hueso intensamente mineralizado se pueden extender longitudinalmente a cortas distancias en las regiones de superposición de las moléculas de colágeno.

La fase mineral es la responsable del mantenimiento de las características mecánicas del hueso, que no desarrollaremos por exceder el objeto de la presente introducción. Las distintas fuerzas y tensiones que soporta el hueso provocan un daño progresivo a la estructura cristalina. Por ello, la fase mineral del hueso debe renovarse continuamente para poder seguir haciendo frente a las demandas mecánicas¹⁵.

La abundancia de minerales en el hueso hace de éste el principal regulador de la cantidad de calcio, fosfato, magnesio y otros oligoelementos del organismo. La vitamina D, la calcitonina y la paratohormona (PTH) modulan la actividad de las células óseas para lograr la homeostasis de estos elementos. (Tabla 1)

TABLA 1: PROTEÍNAS CONTENIDAS EN LA MATRIZ ÓSEA⁴

PROTEÍNA	FUNCIÓN
Osteonectina (SPARC)	Fijación a calcio, apatita y matriz proteica Modula la dhesión celular
α-2-HS-Glycoprotein	Quimiotáctica para monocitos Mineralización via vesículas de matriz
Osteocalcina (Bone GLA protein)	Involucrada en la estabilización de la hidroxiapatita Fijación del calcio Quimiotáctica para monocitos Regulación de formación ósea
Matrix-GLA-proteína	Inhibe la mineralización de la matriz
Osteopontina (Bone Sialoprotein I)	Adhesión celular (via secuencia RGD) Fijación del calcio
Bone Sialoprotein II	Adhesión celular (via secuencia RGD) Fijación del calcio
24K Fosfoproteína (α-1(I) procollagen N-propeptide)	Resíduo del procesado del colágeno
Biglycan (Proteoglycan I)	Regulación del crecimiento de la fibra de colágeno Mineralización y formación ósea Unión a Factores de Crecimiento
Decorin (Proteoglycan II)	Fibrilogenésis de Colágeno Unión a Factores de Crecimiento
Trombospondina y Fibronectina	Adhesión celular (via secuencia RGD) Unión a Factores de Crecimiento Formación de Hidroxiapatita
Otros (incluyendo proteolípidos)	Mineralización
Factores de Crecimiento IGF I, IGF II, TGFβ Proteínas Óseas morfogenéticas (BMPs)	Diferenciación, proliferación y activación de los osteoblastos Inducción de hueso y cartílago en la osteogénesis y reparación de fracturas

2.2 COMPONENTE CELULAR DEL TEJIDO ÓSEO

Existen 5 tipos de células óseas:

- Células Osteoprogenitoras
- Osteoblastos
- Osteocitos
- Osteoclastos
- Células de Recubrimiento Óseo

2.2.1 Células osteoprogenitoras

Las células osteoprogenitoras derivan de las células mesenquimales más primitivas: **célula madre mesenquimal pluripotente o CFU-F**, que da origen a las células osteoprogenitoras y que también tiene capacidad de diferenciarse a fibroblastos, condrocitos, adipocitos, células musculares y células endoteliales. CFU-F se identifica en los cultivos de médula ósea por las colonias a las que da origen y se ha demostrado que tiene capacidad para inducir la formación de hueso cuando se transfiere al tejido conectivo¹⁶.

Las células osteoprogenitoras aparecen en el mesénquima fetal cerca de los centros de osificación. Después del parto y durante el resto de la vida post-fetal se localizan en el endostio y en la capa profunda del periostio.

Morfológicamente se asemejan a fibroblastos ya que poseen núcleos ovales claros y citoplasma claro con límites irregulares. Durante la formación del hueso, las células osteoprogenitoras se dividen y desarrollan a células formadoras de hueso u osteoblastos. Esto ocurre sobre todo durante la vida fetal y la etapa del crecimiento, pero en la edad adulta se puede observar en relación con la curación de fracturas.

2.2.2 Osteoblastos

Los osteoblastos son las células esqueléticas responsables de la síntesis y mineralización de la matriz extracelular del hueso. Nunca se encuentran ni funcionan de manera aislada, sino que se disponen agrupados a lo largo de la superficie del hueso. Son células cuboidales, muy activas desde el punto de vista metabólico, lo cual se traduce morfológicamente en la presencia de un retículo endoplásmico rugoso muy extenso, y de un aparato de Golgi, encargado de la secreción de proteínas, bien desarrollado¹⁷⁻¹⁸.

La membrana plasmática de los osteoblastos es rica en fosfatasa alcalina, propiedad que se utiliza para reconocer esta estirpe celular en tinciones histológicas. La fosfatasa alcalina está directamente implicada en el proceso de mineralización, por lo que su concentración en el suero también se puede utilizar como índice de la actividad osteoblástica.

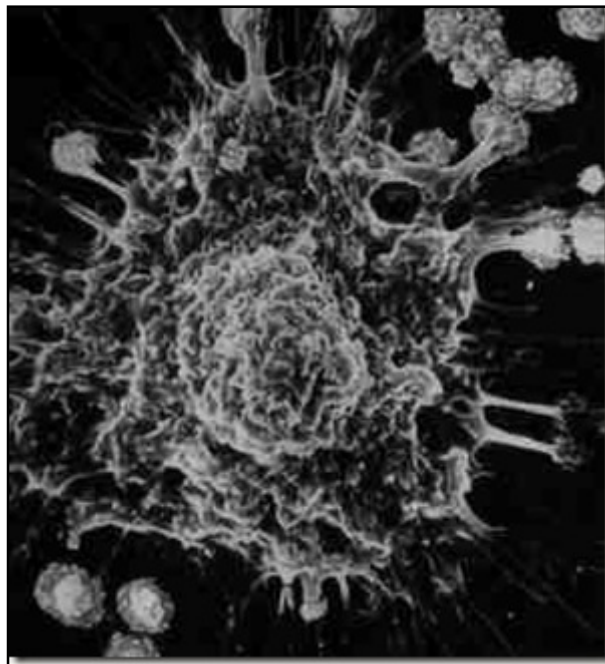


FIGURA 6. Estructura al microscopio electrónico de un osteoblasto maduro, donde se aprecian las características morfológicas anteriormente señaladas. (Cortesía de Tim Ammet. University College of London)

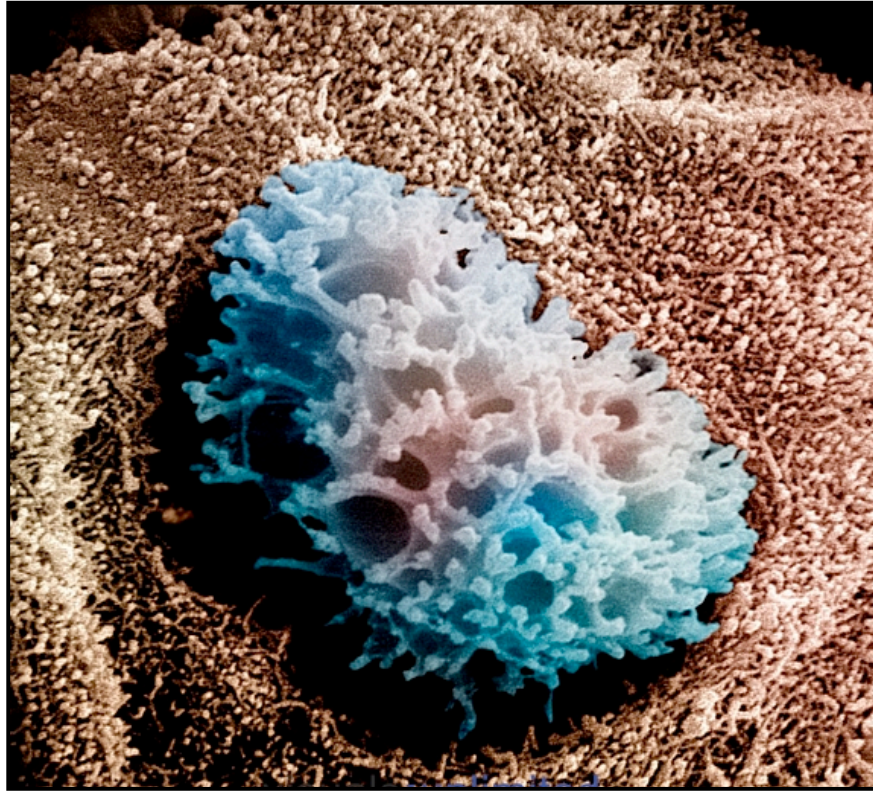


FIGURA 7. Imagen de microscopio electrónico de barrido donde se muestra la imagen de un osteoblasto con sus prolongaciones dendríticas en el interior de una laguna osteocitaria. Winkler T et al. Osteoclastic bioresorption of biomaterials. Int J Artif Organs 2010 198-203

El fenotipo de osteoblasto maduro se caracteriza por su capacidad para sintetizar las proteínas de la matriz ósea, incluyendo el colágeno tipo I y una variedad de proteínas no colágenas, anteriormente descritas, como la osteocalcina, la sialoproteína, la osteopontina y los proteoglicanos. También sintetizan factores de crecimiento, cuyo estudio en detalle se desarrollará en capítulos sucesivos de la presenta Tesis Doctoral, que son almacenados en la matriz ósea, tales como el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), las proteínas morfogenéticas óseas (BMP), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), así como diversos factores locales y citocinas, entre las que se encuentra la interleucina 6 (IL-6)

19,20

Desde un punto de vista filogenético, la estirpe de células osteoblásticas deriva de las células mesenquimales y por tanto son una variedad de células del tejido conectivo.

Debido a que estas células mesenquimales pueden originar numerosos tipos celulares, no se puede hablar de célula formadora de hueso hasta que la célula en desarrollo no se compromete en la estirpe osteoblástica¹⁷.

Previamente a este compromiso, se pasa por las fases de célula precursora pluripotencial (*stem cell*), de célula osteoprogenitora inducible (*células del estroma*), para llegar a la fase de célula osteoprogenitora determinada (*Pre-osteoblastos endostales o periostales*) que constituye el primer escalón dentro de la estirpe osteoblástica ya que se trata de células totalmente comprometidas¹⁸.

El paso final de la progresión celular a lo largo de la estirpe osteoblástica es el osteocito, que es un osteoblasto que ha quedado encerrado en hueso calcificado.

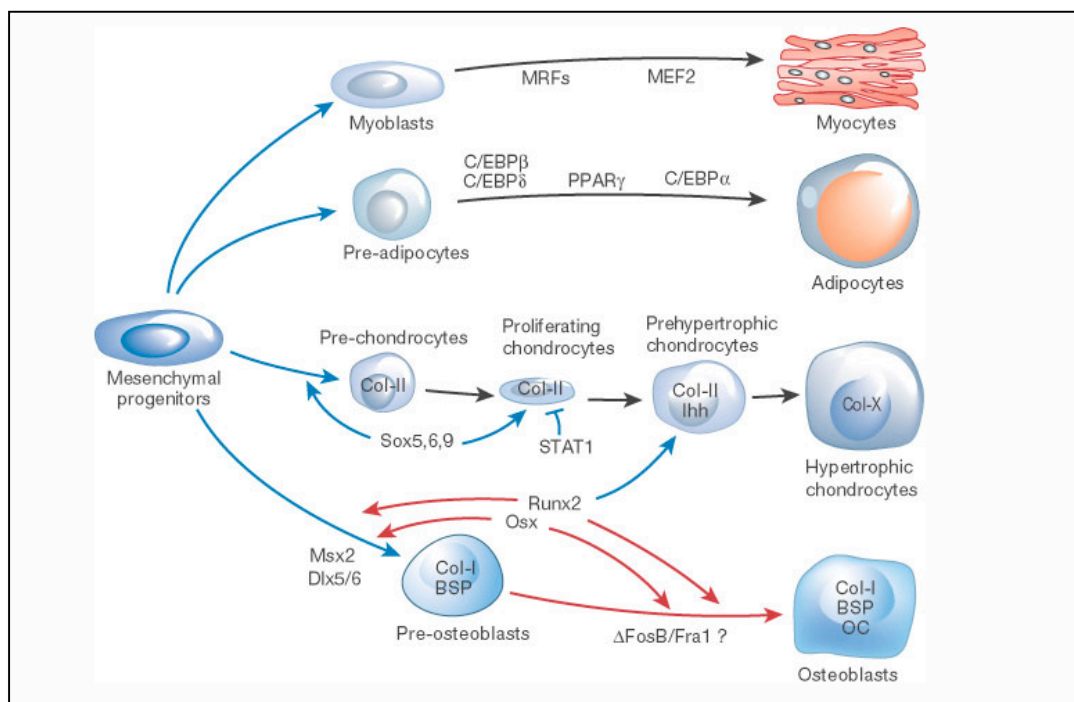


FIGURA 8. Representación esquemática de la vía de diferenciación de la célula mesenquimal pluripotencial hacia el osteoblasto, desde la célula mesenquimal pluripotencial. Harada S. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. Nature 423, 349-355, 2003.

Aproximadamente el 15% de los osteoblastos llegan a convertirse en osteocitos,

mientras que el 85% restantes se transforman en células de recubrimiento óseo cuando finalizan la formación de hueso. Estas células mantienen el contacto con los osteocitos mediante las prolongaciones en los canalículos, unidos por nexos. De este modo es posible el transporte celular de sustancias captadas por las células de recubrimiento óseo, hacia los osteocitos (además de por difusión a través del líquido extracelular que rodea las prolongaciones en los canalículos). En el momento en que se produce el encierro completo del osteocito en su laguna su actividad metabólica disminuye de forma importante, debido a la carencia de difusión de nutrientes.

Para comprender la capacidad de la matriz ósea desmineralizada de inducir la formación de hueso *de novo* es fundamental conocer en profundidad los mecanismos básicos de la osteogénesis:

2.2.2.1 Células Madres Mesenquimales y Diferenciación Osteoblástica

Friedenstein²¹ fue el primero en señalar que la médula ósea contenía células que no sólo poseían una capacidad proliferativa sino que además eran capaces de formar hueso *de novo* cuando se transplantaban *in vivo*. En este sentido, se demostró que a partir de lo que denominaron unidades formadoras de colonias fibroblásticas (CFU-F) se podían formar *in vivo*, hueso, cartílago, adipocitos e incluso tejido fibroso²².

Estas CFU-F son heterogéneas en tamaño, morfología y potencial de diferenciación, de tal forma que podemos encontrar desde células multipotenciales a líneas celulares con potencial más restringido. Esta heterogeneidad, también es evidente en un análisis bioquímico, como demuestran los diferentes patrones de expresión de proteínas reguladoras de procesos tales como angiogénesis, hematopoyesis o inmunidad¹⁸. De todas estas CFU-F, sólo una pequeña proporción son **CFU-fosfatasa alcalina (CFU-**

ALP) y de ellas sólo un pequeño grupo son **CFU-osteogénicas (CFU-O)** (Figura 8).

Estos progenitores comprometidos al desarrollo osteoblástico, en adelante CFU-O, han sido identificados no sólo en poblaciones de células del estroma sino también en poblaciones celulares derivadas del hueso craneal, vértebras y ciertos huesos apendiculares²³.

2.2.2.2 Control del Desarrollo Osteoblástico

En los últimos años se ha identificado el papel crucial que desempeña **Runx2** (anteriormente denominado Cbfa1) en el desarrollo osteoblástico. Runx2 pertenece a la familia del factor de transcripción de homología de dominio **runt**. La importancia de este factor queda patente en los estudios de Komori^{19,20} donde la delección de Runx2 en ratones determinaba el desarrollo de ratones cuyo esqueleto estaba constituido únicamente por cartílago y condrocitos sin evidencia alguna de hueso. En humanos, la delección haploidea de Runx2 determina el desarrollo del fenotipo de la Displasia Cleidocraneal [1]²⁴⁻²⁶. Además, Runx2 es el marcador identificable más precozmente durante el desarrollo de los osteoblastos y sus niveles aumentan en cultivos celulares tratados con proteínas óseas morfogenéticas (BMPs) y otros factores que estimulan la formación ósea²⁷. En este sentido, son numerosas las moléculas identificadas en los últimos años que interaccionan con Runx2. Está fuera del objetivo de esta introducción analizar en detalle todos ellos. No obstante, describiremos alguna de las interacciones de estos factores, para ejemplificar la enorme complejidad de este mecanismo de diferenciación osteoblástica.

¹ **Displasia Cleidocraneal:** La displasia cleidocraneal es una afección con alteración preferente de la osificación membranosa, caracterizada por defectos craneales, claviculares y pélvicos. De transmisión autosómica dominante, con penetrancia completa y expresividad clínica variable, presenta elevada frecuencia de casos esporádicos. La enfermedad está causada por mutaciones en el gen *CBFA1/RUNX2* ubicado en el brazo corto del cromosoma 6.

Por ejemplo, **BHLH** que contiene los factores de transcripción **Twist 1** y **Twist 2** son inhibidores de Runx2 en el esqueleto craneofacial y apendicular respectivamente²⁵. Por otro lado, **Schurri3**, proteína de dedo de zinc, controla los niveles de Runx2 promoviendo su degradación vía la ligasa de ubiquitina **E3 WWP1**²⁸.

Además Runx2 también está regulado por su interacción con transductores de señal, **Smads**, de la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), de la que posteriormente hablaremos en profundidad. Señalar únicamente que por ejemplo Runx2 funciona sinérgicamente con Smad1 y Smad 5 para regular la expresión de genes hueso-específicos²⁹ y así conducir a la osteoblastogénesis *in vitro* e *in vivo*^{29,30}. Es de enorme importancia que la actividad, no sólo de Runx2 sino del resto de factores asociados esté estrechamente regulada, ya que Runx2 puede también inhibir la diferenciación de condrocitos²⁸.

Otro factor que desempeña un papel importante en la osteoblastogénesis es **Osterix (Osx)**, proteína de dedo de zinc que pertenece a la familia de factores de transcripción **SP**, en cuya ausencia, los osteoblastos no se desarrollan³¹.

Finalmente, uno de los factores que más recientemente se han identificado y que parecen desempeñar un papel importante en la diferenciación osteoblástica es la señalización mediada por **Wnt**. Wnts constituyen una familia de 19 proteínas de secreción con capacidad de unirse a receptores de membrana de gran complejidad constituidos por receptores **Frizzled (FZD)-GPCR** y receptores de Lipoproteínas de baja densidad (LRPs), activando cascadas de señalización intracelular. De todas ellas, la mejor caracterizada es la vía canónica Wnt/ β -catenina que mediante LRP-5 y LRP-6 determina la inhibición de la kinasa sintetasa de glucogéno (GSK). La pérdida de la actividad de Lrp-5, determina la aparición de fenotipos con baja masa ósea, mientras que su activación determina un incremento en la masa ósea total³².

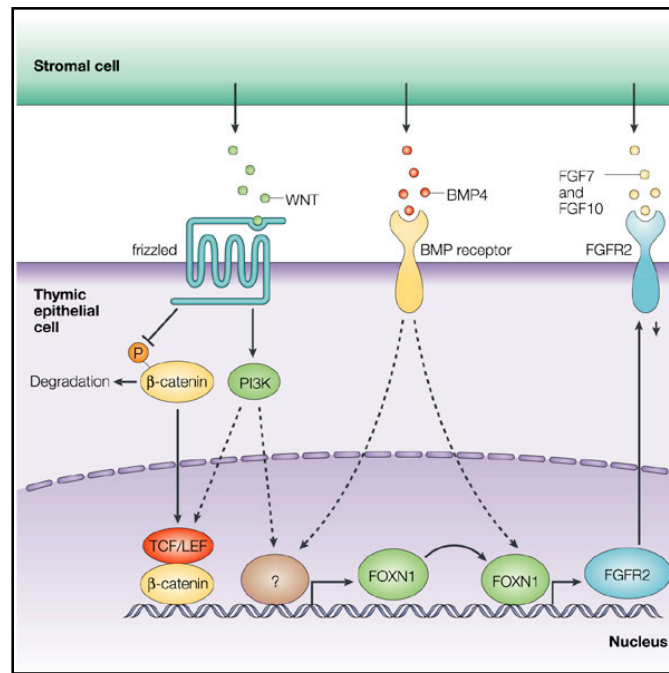


FIGURA 9. Wnt y BMP están implicados entre otros procesos en la activación del factor de transcripción nuclear FOXN1 que a su vez activa la transcripción del receptor del factor de crecimiento fibroblástico (FGFR) que desempeña un papel importante en la osteogénesis. Harada S. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* 423, 349-355, 2003.

El proceso por el cual la célula progenitora se desarrolla hacia un osteoblasto maduro formador de matriz extracelular, no ha sido aún claramente elucidado. A grandes rasgos en dicho proceso se podrían distinguir tres etapas: proliferación, formación de la matriz extracelular y mineralización, cada una de las cuales presenta un patrón de expresión génica único y diferencial. En este sentido, sabemos que la expresión de los genes que con más frecuencia se asocian a osteoblastos (COLLI; ALP; OPN; OCN; BSP y PTH1R) se regulan de forma asincrónica, activándose o inhibiéndose a medida que la célula progenitora se diferencia y la matriz extracelular madura y se mineraliza. Por ejemplo, los niveles de ALP se incrementan rápidamente, para disminuir progresivamente una vez el proceso de mineralización está avanzado. OPN presenta dos picos de expresión durante la proliferación, mientras que BSP se expresa de forma transitoria en fases precoces y en los osteoblastos diferenciados. Por su parte OCN actúa durante la fase de mineralización³³.

En general, la mayor parte de estas moléculas disminuyen su actividad a medida que el osteoblasto se diferencia hacia osteocito. No obstante, algunas de ellos, como **sclerostin** (antagonista de Wnt, que está mutado en la enfermedad de Van Buchem[2] y bloquea la formación ósea inducida por BMP) están aumentadas en las etapas finales de diferenciación celular, poniendo de manifiesto la existencia de un mecanismo de autorregulación²⁹.

De forma simplificada se puede determinar que a partir de la síntesis de Runx2, la progresión en la diferenciación celular viene dada por la secreción de determinadas proteínas, algunas de ellas únicas del tejido óseo (fosfatasa alcalina y osteopontina), y otras características, pero no exclusivas, del hueso (sialoproteína ósea y osteocalcina)³⁰. La secuencia es la siguiente: en primer lugar se expresa el Runx2; luego la osteopontina, la fosfatasa alcalina y los colágenos I, II y III³¹. Más tarde se expresan la osteocalcina y la sialoproteína ósea, cuya secreción indica la diferenciación de preosteoblastos a osteoblastos. La aparición de la sialoproteína ósea marca el inicio de la mineralización, y en ese momento disminuye la expresión de los colágenos II y III. Las BMP inducen tanto la condrogénesis como la osteogénesis. Estos dos tipos celulares comparten ancestros comunes, e incluso pueden transdiferenciarse, hasta en fases avanzadas de la diferenciación celular⁵.

2.2.3 Osteocitos

El osteocito es la célula más abundante del hueso. De acuerdo con Parfitt³⁴, aproximadamente hay 10 veces más osteocitos que osteoblastos en el hueso de un humano adulto. Cada osteocito reside en una laguna alojada en el seno de la matriz

² **Enfermedad de Van Buchem:** Enfermedad autosómica recesiva caracterizada por un sobrecrecimiento del esqueleto debida a una sobreexpresión del gen de Sclerostin (SOST).

intersticial mineralizada que él mismo ha sintetizado. Su cuerpo celular se adapta a la forma lenticular de la cavidad que ocupa, y emite numerosas prolongaciones delgadas que se extienden por los canalículos óseos, hasta contactar con los osteocitos vecinos y con las células de revestimiento óseo².

Los osteocitos maduros se conectan mediante estas prolongaciones con los osteocitos vecinos, mientras que los de reciente incorporación están conectados con los osteocitos adyacentes y con las células de revestimiento de la superficie ósea. No obstante, algunas de estas prolongaciones orientadas hacia la superficie celular parecen atravesar esta capa de revestimiento para establecer contacto directo con el espacio extraóseo³³. Ello sugiere la existencia de un mecanismo alternativo de señalización entre el osteocito y la médula ósea sin la intervención de las células de revestimiento.

Además, los osteocitos parecen capaces de retraer o extender sus prolongaciones dendríticas no sólo entre las células sino también entre los espacios medulares, tal y como muestran las técnicas de imagen dinámica³⁵.

Estos últimos hallazgos no hacen sino poner en evidencia la enorme importancia metabólica del osteocito, cuya actividad clásicamente había sido considerada limitada cuanto menos. Las prolongaciones de dos osteocitos adyacentes están unidas por uniones tipo GAP (*Gap junctions*). Dado que las laguna óseas están además conectadas por los canalículos, es fácil comprender que en el hueso coexisten por tanto dos sistemas de señalización, intra y extracelular.

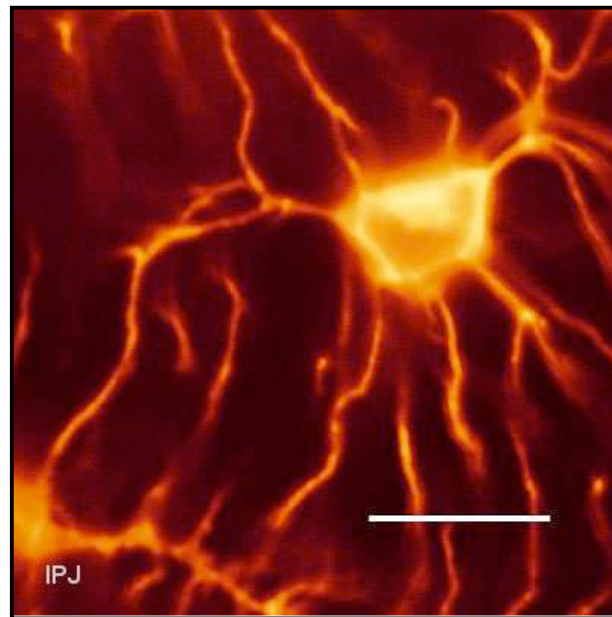


FIGURA 10. Imagen de microscopía óptica de fluorescencia con una muestra de tejido óseo teñido con Alizarina donde se observan con nitidez las prolongaciones o nexos que comunican osteocitos adyacentes. Meyle J. RH 414 a new Dye to stain non-decalcified Bone Tissue. Int Poster J Dental Oral Med. 2001;3:42-46.³⁶.

Como ya se comentó en el apartado anterior los osteocitos se originan a partir de osteoblastos que quedan atrapados en la matriz ósea recién formada durante el proceso de formación del hueso. La transformación se caracteriza por una degradación paulatina del retículo endoplasmático rugoso y del aparato de Golgi. Los osteocitos son semejantes a los osteoblastos, pero su aparato de Golgi está algo menos desarrollado y el citoplasma es menos basófilo. Sin embargo, como señalábamos anteriormente no debe considerarse a los osteocitos células en reposo. De hecho, con microscopía electrónica se puede demostrar que tanto el aparato de Golgi como el retículo endoplásmico rugoso muestran una gran actividad³.

El proceso por el que se estimula la diferenciación de los osteoblastos en osteocitos, no se conoce en detalle. Imai demostró³⁷ que los osteocitos eran capaces de promover el reclutamiento y diferenciación celular mediante la expresión de factor estimulante de osteoblastos (OSF-1).

Progresivamente los osteoblastos se diferencian a osteocitos al quedar englobados en la matriz osteoide que ellos mismos producen, convirtiéndose en ese momento en una nueva fuente de OSF-1 para el reclutamiento de nuevos osteoblastos. La expresión de OSF-1 en osteocitos parece que puede ser activada por mecanismos de daño local o estrés biomecánico³⁷. Marotti² ha postulado que una vez se forma el osteocito, comienza a producir una señal inhibitoria osteoblástica al alcanzar su prolongación citoplásmica la máxima longitud. Ello hace que el osteoblasto inactivado en contacto con dicha prolongación se aplane y, al mismo tiempo que reduce su tasa de formación de matriz ósea, entre en contacto con un número mayor de señales inhibitorias procedentes de prolongaciones adyacentes, para que en última instancia, permanezca atrapado en la matriz osteoide producida por los osteoblastos circundantes.

Finalmente, la célula osteoblástica inactivada adquiere la morfología típica osteocitaria y se calcifica la matriz adyacente. Esta teoría está basada únicamente en observaciones morfológicas y por el momento no existe evidencia bioquímica del mencionado factor inhibitorio. No obstante, Martin³⁸, utilizando este concepto ha sido capaz de elaborar un modelo matemático congruente con las tasas de formación de matriz ósea, durante la remodelación ósea. Además, el osteocito-osteoide produce en gran cantidad un enzima, casein kinasa de tipo II, que es responsable de la fosforilación de las proteínas de la matriz ósea cuyo concurso es esencial para la mineralización de la misma³⁹.

La vida media de los osteocitos depende en gran medida de la tasa de recambio del hueso en el que estén localizados. Así, en huesos con baja tasa de recambio, la vida media del osteocito puede alcanzar varias décadas. La apoptosis osteocitaria es objeto de un gran estudio en la actualidad. Se conoce que dicha apoptosis puede tener lugar como consecuencia de la inmovilización, microdaños, privación de estrógeno, niveles

elevados de citoquinas, tratamiento con glucocorticoides, osteoporosis, osteoartritis y envejecimiento. Parece que la base de todos estos procesos pueda deberse a la pérdida por parte de los osteocitos de su capacidad de detectar los microdaños³⁹, junto con una disminución de la capacidad del osteocito de acceder a nutrientes y oxígeno (como en el caso de las fracturas por estrés)⁴⁰.

2.2.4 Células de recubrimiento óseo (osteocitos de superficie)

Las células de recubrimiento óseo (también denominadas osteocitos de superficie) se originan a partir de osteoblastos que han finalizado la formación de hueso y recubren como una capa de epitelio plano simple todas las superficies óseas internas y externas en las que no hay actividad de osteoblastos u osteoclastos.

Esta capa de células inactivas tiene gran importancia, porque descansa sobre una capa muy delgada de osteoide (matriz ósea no mineralizada). La reabsorción ósea nunca ocurre sobre superficies recubiertas por osteoide u otra matriz ósea no mineralizada (colágeno), por lo que es necesario eliminar esta capa antes de que los osteoclastos entren en contacto directo con el tejido óseo mineralizado y comience la reabsorción. La eliminación de dicha capa tiene lugar cuando las células de recubrimiento óseo se activan y secretan la enzima colagenasa necesaria para eliminar la capa superficial no mineralizada. Una vez degradado el osteoide de la superficie, las células de recubrimiento se retraen y dejan paso a los osteoclastos.

2.2.5 Osteoclastos

Los osteoclastos son las células óseas responsables de la reabsorción o destrucción del hueso. Realizan las funciones opuestas a los osteoblastos: disolución del mineral óseo y degradación de la matriz. Se forman a partir de una célula madre distinta de la que origina los osteoblastos y osteocitos. Las células progenitoras de osteoclastos se originan

a partir de la célula madre de granulocitos y macrófagos (**CFU-GM**) en la médula ósea. Estas células progenitoras llegan al tejido óseo bien por el torrente sanguíneo bien por migración directa. Una vez allí, se diferencian a preosteoclastos, que aún son mononucleados. Los preosteoclastos se fusionan y forman osteoclastos multinucleados maduros.

Los preosteoclastos también tienen capacidad de reabsorción ósea, aunque en menor grado que los osteoclastos maduros y, al igual que ellos, expresan receptores para calcitonina y producen fosfatasa ácida resistente a tartratos (TRAP) que es un marcador específico de osteoclastos y preosteoclastos. La diferenciación y la fusión final con formación de osteoclastos y desarrollo del borde fruncido es estimulada por varias moléculas, de las cuales las más importantes son la IL-6 y la IL-11, secretadas por los osteoblastos^{1,2}.

A menudo los osteoclastos se localizan en cavidades de la superficie del hueso denominadas lagunas de Howship. En esta fase adoptan forma de células de gran tamaño (20 – 50 μm), multinucleadas, conteniendo de 4 a 20 núcleos normalmente y hasta 100 núcleos en estados patológicos. En la superficie orientada hacia el tejido óseo reabsorbido por los osteoclastos se distingue un rayado radial irregular.

Con el microscopio electrónico se demostró que esta superficie fruncida del osteoclasto está constituida por profundos plegamientos y bolsas del plasmalema. Entre los pliegues y las bolsas se distinguen cristales de mineral óseo.

El citoplasma contiene varios complejos de Golgi, numerosas mitocondrias y suele estar muy vacuolado. Se ha demostrado que muchas de las vacuolas son lisosomas primarios, positivos para fosfatasa ácida. Las enzimas lisosomales se vacían a un espacio cerrado, el espacio subosteoclástico cerrado en la periferia por una zona anular, la zona

de sellado. La membrana celular del osteoclasto está aquí firmemente unida a la matriz ósea mediante moléculas de adhesión celular incluidas en ella.

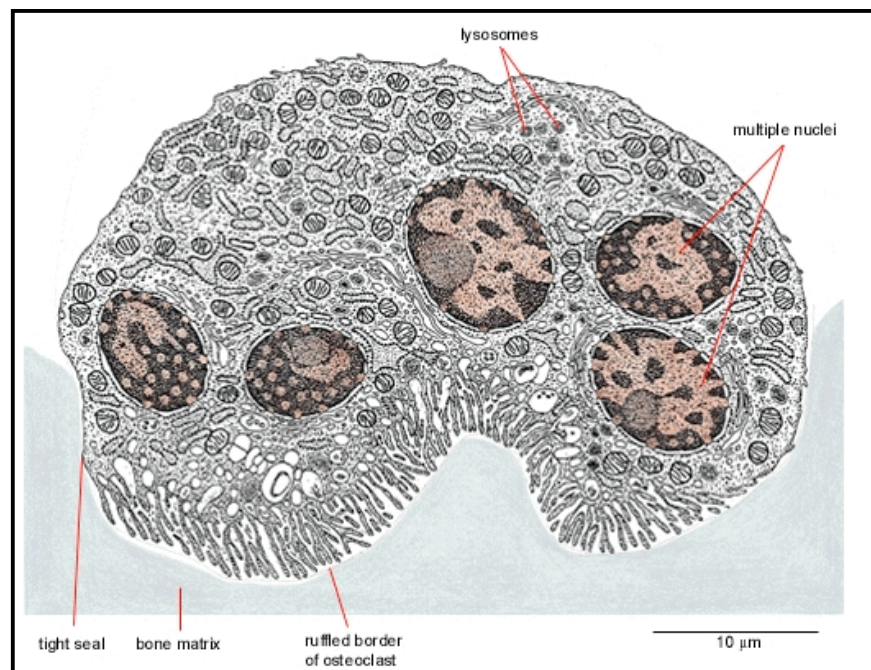


FIGURA 11. Imagen de microscopía electrónica donde se muestra la estructura del osteoclasto como célula gigante multinucleada. Presenta un borde rugoso (“ruffled border”) donde se secretan las enzimas y las hidrolasas. (Modificado de: R.V. Krstic, *Ultrastructure of the Mammalian Cell: An Atlas*. Berlin: Springer, 1979.)

La reabsorción ósea se inicia con la producción por parte de los osteoclastos de iones hidrógeno y enzimas proteolíticas. Los iones hidrógeno son producidos por la anhidrasa carbónica tipo II y luego transportados desde el citosol de los osteoclastos hacia el lugar situado bajo el borde rugoso de las células por una bomba de protones, acidificando el compartimiento subosteoclástico que está delimitado en su periferia por una zona anular, la zona de sellado (“tight seal”).

Esta acidez local produce la disolución del mineral óseo. Posteriormente las enzimas lisosomales sintetizadas por los osteoclastos son secretadas a través del borde rugoso a la zona de reabsorción ósea extracelular, alcanzando una alta concentración en la misma.

La unión del medio ácido con la acción enzimática da lugar a la degradación de la

matriz ósea. En ella, los osteoclastos son capaces de fagocitar los osteocitos, el colágeno y el mineral⁴¹.

Tras la finalización de la reabsorción se cierra la superficie ósea libre con una línea de cemento que se forma inmediatamente después y el osteoclasto, se desplaza con rapidez sobre la superficie del hueso para comenzar una nueva reabsorción.

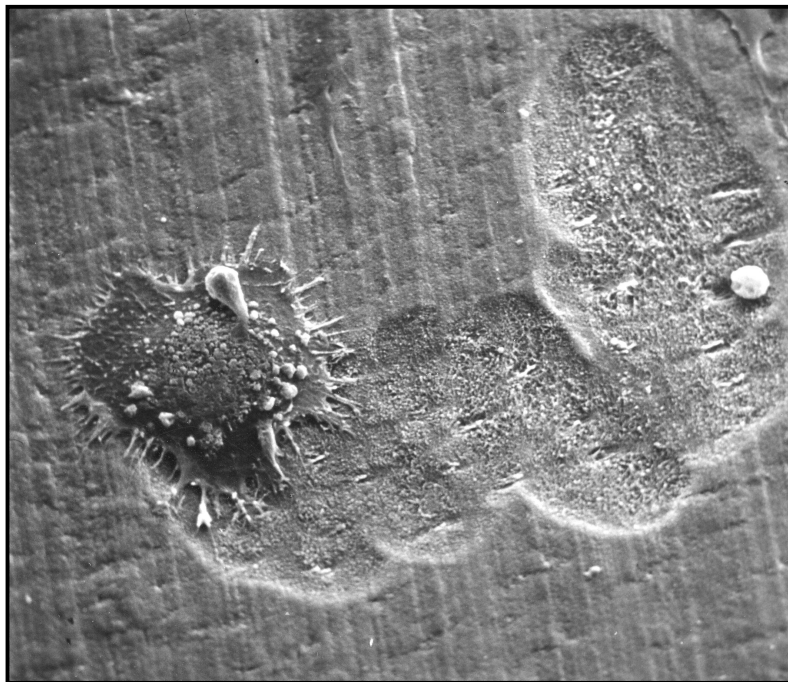


FIGURA 12. Imagen de microscopía electrónica de barrido donde se aprecia el trayecto realizado por un osteoclasto activo durante el proceso de resorción ósea. (Cortesía de Tim Amett, University College London).

El reclutamiento y la actividad de los osteoclastos es estimulada por citoquinas secretadas por los osteoblastos, en especial IL-1, IL-6 e IL-11. La estimulación de la reabsorción ósea favorecida por la hormona hormona paratiroidea es indirecta, a través los osteoblastos que tienen receptores para la hormona paratiroidea, a diferencia de los osteoclastos.

3. OSIFICACIÓN U OSTEOGÉNESIS

La formación de tejido óseo (osteogénesis u osificación) consiste en la síntesis y secreción de matriz ósea orgánica por los osteoblastos, que al poco tiempo sufre mineralización. La zona del hueso donde se inicia la osificación se denomina **núcleo óseo o centro de osificación**. La mayoría de los huesos se osifican desde varios centros de osificación que se originan en diferentes momentos. El primer punto de osificación se denomina centro de osificación primario, los posteriores son centros de osificación secundarios. En ocasiones, se puede originar en varios puntos que se fusionan rápidamente para formar un centro primario, siendo éste del que se va a desarrollar la mayor parte del hueso.

Existen dos formas de osteogénesis: intramembranosa y endocondral. El desarrollo del hueso en la osificación intramembranosa se produce directamente en el tejido conectivo primitivo del feto (mesénquima), mientras que el desarrollo óseo por osificación endocondral tiene lugar sobre un molde preformado de cartílago.

3.1 OSIFICACIÓN MEMBRANOSA

La osificación membranosa se caracteriza por la transformación directa de las células mesenquimales en osteoblastos. Mediante este mecanismo se desarrollan los huesos planos de la bóveda craneal, incluyendo las suturas craneales, parte de los huesos faciales y la mandíbula, así como la clavícula.

El modelo característico de osificación membranosa es la osificación a nivel de las suturas craneales⁴¹. Dado que para seguir el ritmo de crecimiento del encéfalo es necesario aumentar la cavidad craneana, es necesaria una reabsorción simultánea del tejido óseo de las superficies exterior e interior con depósito continuo sobre ambas superficies y sobre los bordes o suturas.

La formación de hueso comienza dentro de una placa membranosa densa de mesénquima que rodea el cerebro. Éste se produce por división activa y condensación de las células mesenquimáticas en un tejido conectivo muy vascularizado. En ciertas zonas de este mesénquima, un grupo de células se diferencia a osteoblastos, que poco después comienzan a secretar matriz ósea orgánica. Al microscopio se presenta como una pequeña masa densa homogénea eosinófila rodeada por osteoblastos. Esta matriz recién formada, aún no calcificada se denomina osteoide y está compuesta, como vimos anteriormente, por proteoglicanos y fibras de colágeno, es decir, la parte orgánica de la matriz ósea sin el contenido de sales minerales.

Tras la formación de la matriz ósea, ésta sufre una rápida mineralización por depósito de fosfato cálcico, volviéndose más eosinófila. El centro de osificación crece en tamaño debido a que durante los posteriores depósitos sobre la matriz se incorporan osteoblastos de la capa circundante, que se transforman en osteocitos y se mantienen unidos entre sí y con los osteoblastos por finas prolongaciones. Como señalábamos anteriormente, los osteoblastos incorporados son reemplazados por otros, que se diferencian a partir de las células mesenquimáticas circundantes. Los pequeños islotes o trabéculas aisladas de tejido óseo recién formado se suelen ubicar equidistantes de los vasos sanguíneos circundantes, por lo que a medida que las trabéculas formadas hacen contacto con las zonas vecinas semejantes generan una especie de tejido óseo esponjoso con tejido conectivo muy vascularizado en los espacios, denominado **esponjosa primitiva**.

En los sitios donde con posterioridad se formará tejido óseo compacto tiene lugar un engrosamiento constante de las trabéculas por depósito de tejido óseo recién formado, por lo que se estrechan de forma gradual los espacios ocupados por tejido conectivo alrededor de los vasos sanguíneos. Así se origina una **compacta primitiva** en la que los vasos están ubicados en pequeños canales que contienen tejido conectivo. En ambos

tipos de tejido óseo primitivo las fibras de colágeno se entrecruzan al azar, por lo que se denomina hueso entretejido (*woven bone*). En la posterior remodelación del tejido se origina tejido óseo maduro con las fibras ordenadas de forma laminar. Debido a las capas concéntricas irregulares de osteocitos y a cierta separación en capas de las fibras de colágeno (pero sin la disposición paralela en cada capa), la compacta primitiva puede presentar cierta semejanza superficial con los sistemas de Havers, por lo que se denomina sistemas de Havers primitivos u osteonas primitivas. El resultado del proceso es la formación de un tejido óseo primitivo vascularizado rodeado por una membrana condensada de mesénquima, que más tarde se transforma en periostio.

Como comentábamos al inicio de este apartado, las suturas craneales se corresponden con las zonas de tejido fibroso que unen los huesos de la bóveda craneal durante el crecimiento del neurocráneo, que a su vez se corresponde con la etapa de mayor actividad osteoformadora y constituyen el prototipo de osificación membranosa. Las suturas deben ser permeables y al mismo tiempo deben permitir una formación rápida de hueso en los márgenes de los huesos, con el fin de acomodar el crecimiento rápido y expansivo del neurocráneo^{42,43}.

Hoy en día se conoce que el cierre de las suturas está firmemente regulado por factores de crecimiento y de transcripción (BMPs, FGFs y FGFR 1-3, *EFNB1*, *TWIST1* y *MSXs*) que están involucrados en la señalización epitelio-mesenquimal entre el mesénquima de la sutura, la duramadre y los márgenes de los huesos.

Se cree que precisamente en estos bordes se desarrolla un gradiente de factores de crecimiento que son los responsables de iniciar la formación de las suturas. Por ejemplo, un gradiente de ligandos de FGF que abarca desde niveles elevados en la región diferenciada a niveles bajos en el entorno de las células madre osteogénicas, modula la expresión de *FGFR1* y *FGFR2*. A su vez, la señalización a través de FGFR2 regula la

proliferación de células madre, mientras que la señalización mediada por FGFR1, estimula la diferenciación osteogénica⁴⁴. A medida que las suturas se fusionan, los factores involucrados en la diferenciación (*SHH*, *MSX1*) disminuyen su actividad mientras que al mismo tiempo se incrementa la expresión de *RUNX2* y Colágeno I (*COL1A1*) en los frentes de osificación. Al finalizar el proceso, la sutura fusionada, es indistinguible del hueso adyacente.

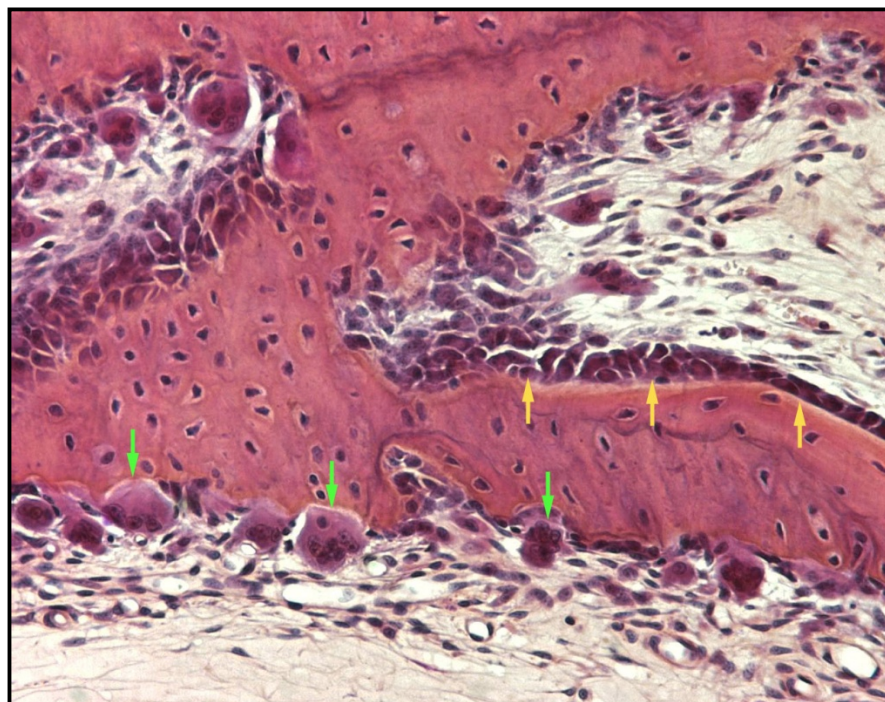


FIGURA 13. Imagen representativa de los fenómenos combinados de aposición ósea mediada por osteoblastos (flechas amarillas) y de reabsorción ósea mediada por osteoclastos (flechas verdes) característicos del metabolismo de las suturas craneales.
https://www.ucl.ac.uk/biosciences/.../tim.../arnett_lab

3.2 OSIFICACIÓN ENDOCONDRALE

En este proceso la formación de hueso es precedida por una fase intermedia de tejido cartilaginoso. Por este mecanismo se forman los huesos de la base del cráneo, el esqueleto del tercio medio facial, la columna vertebral, la pelvis y las extremidades. Las fracturas óseas que curan mediante callo comparten algunas características de la

osificación endocondral.

Se inicia con la formación de un molde de cartílago hialino a partir del mesénquima primitivo¹. En un momento dado, se produce un llamativo agrandamiento de los condrocitos en la porción media del molde cartilaginoso, en lo que se denominará el **centro primario de osificación**. Las células de esta región se hipertrofian, acumulan glucógeno en su interior y el citoplasma se hace muy vacuolado. A medida que los condrocitos se hipertrofian, se comienza a depositar una matriz donde se iniciará la calcificación del cartílago por el depósito de nidos de cristales de fosfato cálcico. En este momento los condrocitos hipertróficos degeneran y mueren⁴⁵.

La diferenciación de los condrocitos está regulada por diversos factores. El primero que se demostró que controlaba dicho proceso era el péptido relacionado con la paratohormona (**PTHrP**) que actúa fundamentalmente a nivel de los receptores de PTH localizados en los condrocitos prehipertróficos, promoviendo una estimulación sostenida de la proliferación condral. En ratones PTHrP knock-out, el fenotipo se caracteriza por un acortamiento óseo causado por una hipertrofia condrocítica prematura. La sobreexpresión de PTHrP, genera el efecto opuesto con retrasos en la maduración condrocítica. PTHrP es parte de una cascada de señalización genética, donde interacciona no sólo con factores expresados en fases iniciales de la diferenciación de los condrocitos, como Indian hedgehog (**Ihh**) sino con otros factores tales como FGF o BMPs, o incluso con los propios condrocitos, alterando su expresión génica.

Al mismo tiempo que se produce apoptosis de los condrocitos hipertróficos, las células del pericondrio comienzan a depositar una delgada capa de hueso inmaduro, la **banda perióstica** que posteriormente se remodelará hacia hueso cortical. A partir de este momento esta capa se denominará **periostio**.

El cartílago embrionario es avascular. Una vez se ha producido la calcificación del hueso inmaduro situado en la periferia, los vasos sanguíneos del periostio, precedidos por osteoclastos crecen hacia las cavidades remanentes tras la muerte de los condrocitos hipertróficos hacia el interior del centro de osificación primario. Con este tejido vascular viajan células pluripotenciales, que dan lugar a las células de la médula ósea y a los osteoblastos. Éstos últimos se disponen como una capa epitelioides sobre las superficies irregulares de la matriz cartilaginosa calcificada, y comienzan a depositar matriz ósea.

Por tanto, en primer lugar y hasta que se producen los fenómenos de remodelación ósea, las primeras trabéculas óseas se producen tanto por condrocitos como por osteoblastos. Junto a las yemas vasculares que penetran hacia el centro de osificación viajan además osteoclastos que serán los encargados de eliminar la matriz cartilaginosa calcificada para que pueda ser remplazada por el hueso inmaduro esponjoso sintetizado por los osteoblastos. Posteriormente, dicho hueso se remodelará hacia el hueso esponjoso o trabecular maduro.

Los centros de osificación secundarios comienzan a formarse a nivel de las epífisis según el modelo de osificación endocondral. Durante el crecimiento, antes de alcanzar la madurez esquelética, se puede identificar en los extremos epifisarios una zona de cartílago epifisario, denominado placa de crecimiento que se sitúa entre los centros de osificación primario y secundario.

La sucesión de ciclos de diferenciación condral, mineralización y remodelación va a permitir el crecimiento longitudinal del hueso. Progresivamente la actividad proliferativa de la placa de crecimiento decae, haciéndose cada vez más fina hasta alcanzar un punto de equilibrio entre los fenómenos de mineralización y reabsorción, momento en el que se considera que el crecimiento se ha detenido. A nivel de la placa epifisaria podemos observar las diferentes etapas de la diferenciación condrocítica que forman parte del

proceso de formación ósea endocondral (Figura 14). En primer lugar encontramos una zona proliferativa donde los condroblastos se dividen activamente y sintetizan matriz de forma significativa. Estas células adquieren progresivamente un mayor tamaño en las zonas pre-hipertróficas e hipertróficas.

La matriz longitudinal cartilaginosa depositada se calcifica de forma selectiva (zona de calcificación provisional). Progresivamente los condrocitos adoptan una configuración altamente vacuolada, tras lo cual se inducen fenómenos de apoptosis.

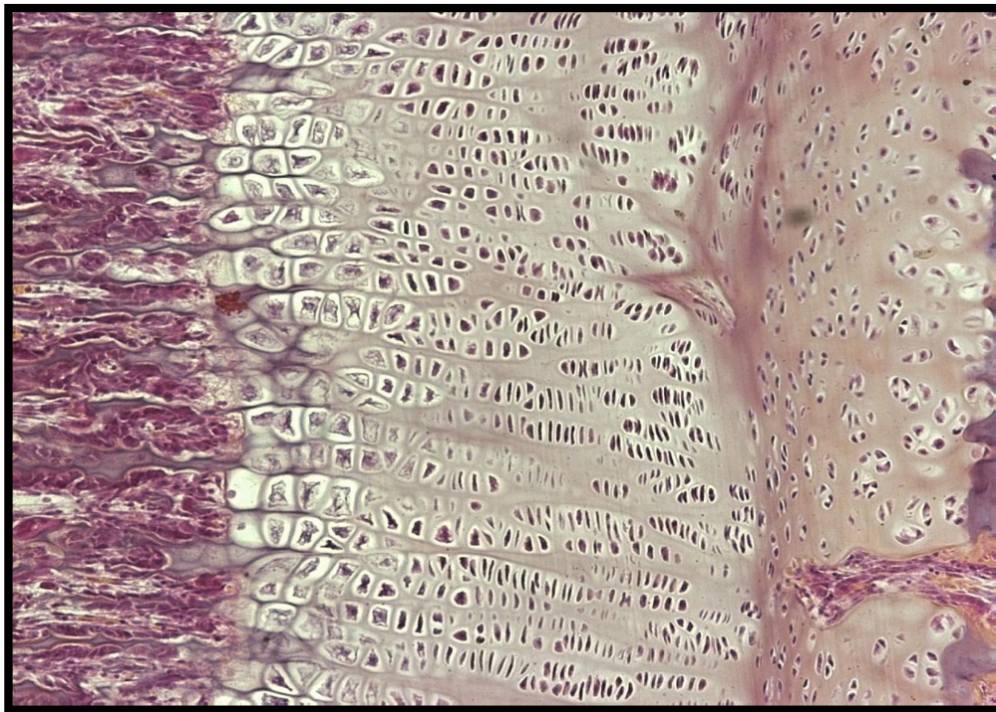


FIGURA 14. Corte histológico de la placa epifisaria donde podemos observar las diferentes etapas de la diferenciación condrocítica que forman parte del proceso de formación ósea endocondral. Adaptado de Cummings Anatomy. Pearson Education, 2.004.

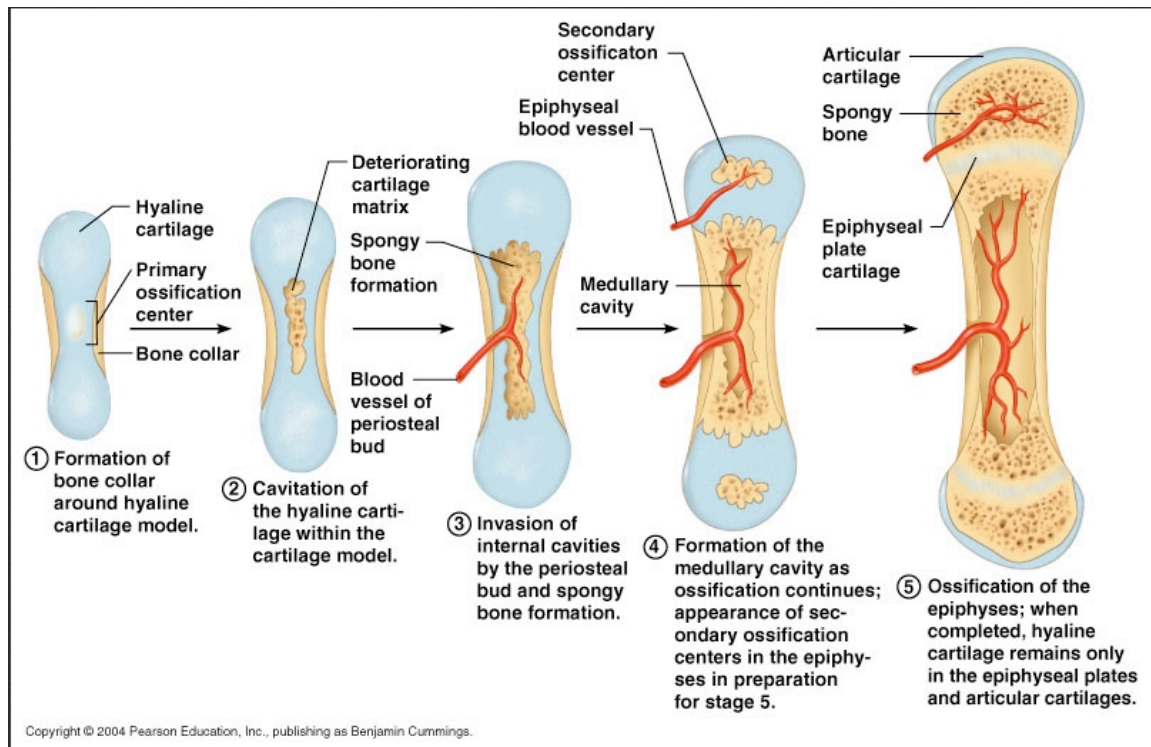


FIGURA 15. Representación esquemática del proceso de osificación endocondral a partir de los centros de osificación primarios y secundarios. Adaptado de Cummings Anatomy. Pearson Education, 2.004.

Existen diferencias en la osificación de los diferentes huesos entre el ser humano y los roedores⁵. En el ratón la clavícula es de origen endocondral. Por el contrario, todo el maxilar superior es de origen membranoso, exceptuando la parte alta y medial de los huesos nasales. El reborde orbitario superior tiene origen endocondral.

En la rata podemos encontrar además durante el periodo fetal un hueso interparietal, impar, que tiene un origen endocondral (aunque según Rice, el hueso interparietal es de origen membranoso⁴⁷). Este hueso, entre el parietal y el occipital, se fusiona con el hueso occipital antes del nacimiento.

3.3 PROCESO DE REGENERACIÓN ÓSEA EN FRACTURAS

El tejido óseo es el único capaz de repararse a sí mismo de forma eficaz gracias a la capacidad de reactivar los procesos que tienen lugar durante la embriogénesis.

Estos procesos reparativos se desencadenan normalmente a partir de soluciones de continuidad del hueso secundarias a trauma externo o tras una osteotomía quirúrgica. Por otro lado, la fatiga mecánica puede causar microfracturas trabeculares que, si bien no modifican la morfología externa del hueso, si se reparan formando microcallos de fractura de forma similar al proceso reparativo a mayor escala.

Aunque los procesos biológicos básicos de regeneración y remodelación son similares entre las diferentes especies, la intensidad y cronobiología de los mismos puede variar de una especie a otra. Además, también podemos encontrar variabilidad entre individuos de la misma especie, así como según la localización anatómica del defecto, la edad o sexo del individuo o la existencia de patología sistémica (diabetes, osteoporosis, etc.)

Según la especie animal existen diferentes tiempos de regeneración y remodelado. A grandes rasgos podríamos decir que existe una relación inversa entre el índice y el potencial de regeneración ósea y la fase evolutiva en la escala filogenética. Así, en el hueso cortical del ser humano cada ciclo de remodelado, denominado *sigma*, dura aproximadamente cuatro meses; en el perro tres meses; en el conejo seis semanas y en la rata de tres a cuatro semanas. I

gualmente encontramos diferencias cualitativas en el proceso de regeneración entre especies, de tal forma que en conejos se han observado patrones de sobreexpresión de BMP-7 en estudios de distracción ósea, en contraposición con la presencia de niveles relativamente normales del mismo factor cuando se realizaban los mismo diseños experimentales en ratas^{2,48}.

Respecto al parámetro de edad, sabemos que a medida que el sujeto envejece, se produce una disminución del número de células mesenquimales indiferenciadas disponibles, junto con una menor respuesta de los osteoblastos a los factores solubles.

Estos osteoblastos tiene además una capacidad tres veces menor para producir matriz mineralizada y expresar fosfatasa alcalina, como índice de regeneración ósea. Hollinger y cols^{48,49} observaron, por otro lado, que en un modelo experimental de fractura en ratas, la expresión de osteopontina era evidente en los animales de 6 meses, siendo negativa para animales con edades superiores a 24 meses.

En la misma línea, el dimorfismo sexual va a influir de manera determinante en el metabolismo óseo, principalmente por la influencia diferencial del perfil hormonal sistémico entre hombres y mujeres⁴. En este sentido, parece que la función osteoclástica se mantiene constante en el hombre a lo largo de su vida mientras que en la mujer se ve incrementada en las primeras etapas postmenopáusicas. Por otro lado, el hombre presenta como factor protector el efecto de de las hormonas androgénicas.

En relación con la localización anatómica, parece que el remodelado sucede de forma diferente en las diversas estructuras óseas del organismo. Boskey et al⁵⁰ compararon los fenómenos de remodelado en cresta ilíaca, foramen mandibular y ángulo mandibular en 50 cadáveres humanos. Observaron que la porosidad cortical (parámetro histomorfométrico definido por la presencia de osteonas en fases activas de remodelado) era mayor en la cresta ilíaca. El tamaño de las osteonas era mayor en la mandíbula que en la cresta ilíaca y también eran mayores en los hombres que en las mujeres. Ello parece debido a que las regiones que soportan tensión desarrollan osteonas de mayor tamaño que en las zonas de compresión.

En este sentido, analizando los diferentes comportamientos del hueso en función de su localización anatómica se ha desarrollado el concepto de Dominio Anatómico Regional:

Dominios Anatómicos Regionales

El concepto de dominio anatómico regional (RAD) integra las diferentes propiedades anatómicas, embriológicas, biomecánicas y fisiológicas de las regiones anatómicas craneofaciales y del esqueleto axial y apendicular⁵⁰⁻⁵³. Las RAD se caracterizan por presentar características biomecánicas propias que determinan el patrón de información molecular y celular responsable de la regeneración ósea y por tanto influye en el diseño de tratamientos.

Los RAD están subdivididos a su vez en unidades mecanoanatómicas o MAUs como consecuencia de la variedad de estímulos biomecánicos dentro de una misma región anatómica. De esta forma la señalización biomecánica a nivel del hueso alveolar es claramente diferente de aquella que se origina en la porción basal del hueso mandibular. No obstante, a pesar de que encontramos diferentes MAUs en las Rads, éstas comparten una serie de características comunes que incluyen tanto los fenotipos celulares presentes en ellas (por ejemplo osteoblastos, osteoclastos y osteocitos) como las moléculas de señalización (por ejemplo BMPs).

El concepto de RAD plantea dos cuestiones importantes:

- 1) ¿La utilización de factores de crecimiento (por ejemplo BMP o PDGF) actuará únicamente sobre la zona aplicada o tendrá un efecto a nivel global sobre el esqueleto?
- 2) ¿Si un factor de crecimiento determinado actúa sobre el esqueleto apendicular (por ejemplo la tibia), tendrá la misma efectividad en la región craneofacial (por ejemplo en mandíbula) y viceversa?

Estas dos cuestiones como veremos posteriormente, tienen gran importancia en la validación de la fase experimental del presente proyecto de Tesis Doctoral dado que los compuestos estimuladores de la regeneración ósea que se emplearán en la misma son

obtenidos inicialmente del esqueleto apendicular y aplicados posteriormente en el esqueleto craneofacial.

La experiencia clínica así como la literatura publicada al respecto en los últimos años pretenden responder estas cuestiones.

En primer lugar no parecen existir diferencias en el resultado final tras la regeneración ósea inducida tanto en la región apendicular (tibia) frente a la región craneofacial. No obstante, en la regeneración del esqueleto apendicular encontramos una fase intermedia de condrogénesis. No así en la región craneofacial, a no ser que se produzca una inestabilidad de los fragmentos durante el proceso de regeneración. En segundo lugar y tal y como referíamos anteriormente, dada la similitud estructural de las RADs es razonable pensar que responderán de forma similar y predecible a una misma estrategia terapéutica con un determinado factor de crecimiento (por ejemplo BMP-2)

A continuación describiremos el proceso de reparación y remodelado del hueso secundario a un traumatismo o lesión.

3.3.1 Fase de Reparación

La lesión en el tejido óseo (por ejemplo una fractura) provoca una laceración de los vasos sanguíneos con exudado de líquidos y proteínas plasmáticas e inmediatamente después, formación de un coágulo de fibrina por activación de la cascada de la coagulación, vasoconstricción y necrosis de los bordes óseos de la fractura. La degradación proteolítica de la matriz extracelular genera subproductos con actividad quimiotáctica capaces de atraer a monocitos y macrófagos al lecho de la herida

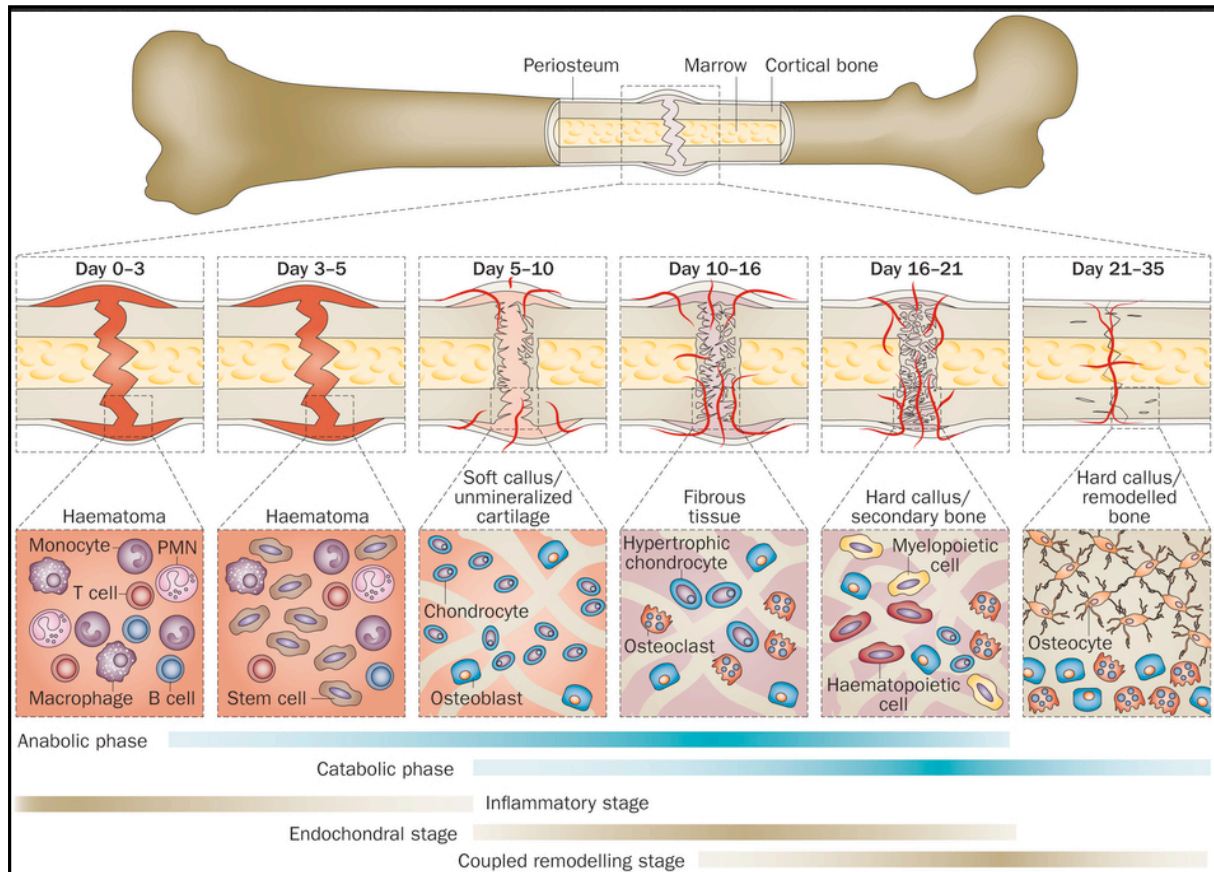


FIGURA 16. Esquema del proceso de reparación ósea desde la formación de un coágulo estable y hasta la remodelación del calo de fractura. Adaptado de Einhorn y Cols⁵¹.

Los macrófagos activados liberan factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) y factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), que van a estimular a las células endoteliales para que expresen factor activador del plasminógeno y procolagenasa. Al mismo tiempo, se liberan factores de crecimiento de los gránulos alfa de las plaquetas activadas. Entre ellos destacan las tres formas isoméricas del PDGF: factor transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), TGF- $\beta 2$ y VEGF que van a ser los encargados de iniciar el proceso de regeneración⁵¹. La sangre extravasada termina formando un coágulo, se produce un hematoma y un tapón hemostático y de esta forma disminuye la pérdida sanguínea. Las plaquetas controlan el complejo proceso de la cascada de coagulación y por tanto

desempeñan un papel doble: regulan la hemostasia y liberan mediadores de señalización, fundamentalmente, PDGF, TGF- β y FGF.

Inicialmente, el medio ambiente de la zona lesionada se caracteriza por una disminución de la tensión parcial de oxígeno y del pH (hasta aproximadamente 4-5), condiciones necesarias para la actividad de los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos y de los macrófagos. Los primeros se encargan de eliminar los focos infecciosos y los microdetritus, mientras que los macrófagos se encargan de limpiar la herida de los materiales de desecho de mayor tamaño, pudiendo transformarse en células gigantes multinucleadas ante la presencia de fragmentos de hueso necrótico o infección persistente. Los macrófagos aportan una capacidad de síntesis formidable a la zona lesionada gracias a la capacidad de producir y secretar factores de crecimiento que potencian la actividad celular, estimulan la mitogénesis y favorecen la quimiotaxis⁵².

Aproximadamente de 3 a 5 días tras la fractura se considera que ya se ha desarrollado un sistema organizado de reparación que está constituido básicamente por vasos sanguíneos de nueva formación, diferentes variedades de colágeno y células (fibroblastos y macrófagos fundamentalmente).

La unión selectiva de los factores de crecimiento a los diferentes tipos de colágeno permite su posicionamiento, protección y su interacción con las células diana. Por este motivo, el componente de colágeno de la herida en reparación es fundamental para potenciar la presentación de los factores moduladores tales como TGF- β , FGF, PDGF y las BMPs a las células diana. Es más, el sustrato colágeno proporciona una estructura sólida que funciona como matriz ósea provisional⁵³.

Por ejemplo, células indiferenciadas que discurren por los vasos neoformados, así como células osteoprogenitoras localizadas en el endostio y el periostio, son atraídas

hacia la zona de fractura por factores quimiotácticos (por ejemplo TGF- β y PDGF), de forma que al alcanzar el tejido de granulación se anclan al colágeno de que está formado y se diferencian a condrocitos y osteoblastos bajo la influencia de factores de diferenciación tales como, BMPs y TGF- β . La combinación de la capacidad de anclaje celular, trasducción e interacción célula-factor es la responsable de la diferenciación de las células pluripotenciales hacia un fenotipo determinado, permitiendo de esta forma la reparación ósea.

Durante varias semanas tras la fractura, la diferenciación gradual de las células, la acumulación de los productos de secreción celular y la maduración de la propia matriz extracelular determinan la formación del callo de fractura. La función de este callo, compuesto por elementos vasculares, estroma, cartílago y células, es fundamentalmente estabilizar los fragmentos óseos durante el proceso de reparación de la fractura.

La estabilidad mecánica del foco de fractura es de gran importancia. La modificación experimental de las condiciones biomecánicas de la fractura, induciendo una mayor o menor movilidad de los focos de fractura, conduce a respuestas biológicas que van desde la osificación intramembranosa directa a la pseudoartrosis. Carter, en 1.998⁵¹, revisó las influencias mecánicas sobre el tipo de cicatrización ósea: el movimiento cíclico provoca la formación de un gran callo; y la carga intermitente provoca, según sus características de dirección e intensidad, distintas reacciones tisulares. Así, la osificación intramembranosa se produce en condiciones de baja tensión y compresión; la condrogénesis se estimula por la compresión hidrostática de mayor intensidad; la tensión de alta intensidad provoca formación de tejido fibroso; la combinación de tensión de alta intensidad con compresión induce la formación de fibrocartílago; y por último, la mala vascularización provoca la formación de cartílago en un ambiente que por sus características mecánicas sería osteogénico.

Existen ciertas diferencias entre el proceso de reparación ósea de fracturas en huesos de origen enocondral frente a huesos de origen membranoso. A continuación señalamos alguna de ellas.

3.3.1.1 Reparación de las fracturas de huesos de origen endocondral

Einhorn ha estudiado en detalle los fenómenos que conducen a la curación de las fracturas de los huesos largos en la rata sin fijación rígida^{52,53}. El cartílago del callo de fractura se calcifica de forma similar al modelo básico de la osteogénesis endocondral: los condrocitos se hipertrofian, dejando finos tabiques de matriz cartilaginosa entre ellos. Estos tabiques de matriz cartilaginosa se calcifican por aposición de cristales de fosfato cálcico. En ese momento los condrocitos hipertróficos mueren, y los espacios vacíos que dejan son ocupados por brotes vasculares provenientes de los tejidos adyacentes. Los pericitos de estos brotes vasculares experimentan diferenciación osteoblástica, y comienzan a secretar matriz ósea. La matriz ósea se mineraliza y el espacio de la fractura queda completamente relleno de hueso inmaduro, preparado para la remodelación ósea.

A medida que el proceso de regeneración avanza el cartílago se reemplaza completamente por hueso inmaduro. Éste se caracteriza por presentar una gran densidad celular, menos mineralizado, con espículas de hueso inmaduro orientadas al azar. Progresivamente el hueso inmaduro es sustituido por hueso laminar, que al contrario que el anterior, presenta menor densidad celular y estructuralmente se caracteriza por presentar láminas de hueso orientadas regularmente en función de las líneas de fuerza biomecánicas.

En condiciones normales, en un paciente adulto, el proceso de curación se completa en unas 6 a 8 semanas.

3.3.1.2. Reparación de las fracturas de huesos de origen membranoso

En comparación con los huesos de origen endocondral, hay pocos modelos experimentales con fracturas de huesos membranosos. Craft⁵³ utiliza osteotomías en el arco cigomático y en el cuerpo mandibular del conejo (ésta una fractura inestable y aquélla una fractura estable). En su estudio demuestra que desde el punto de vista microscópico, la evolución de la fractura es similar a la del hueso endocondral (tanto en el arco cigomático como en la mandíbula). En particular, se demuestra una fase de callo cartilaginoso. Granstrom, igualmente⁵⁴, en un modelo de fractura mandibular en la rata demuestra que la formación de hueso reparativo se produce por formación directa de trabéculas óseas, pero también mediante la formación de un tejido condroide que luego es reemplazado por hueso. Por el contrario, Alberius⁵⁵ en un modelo de fractura craneal y defecto de tamaño no crítico (3 mm de diámetro) en la rata, no encuentra formación de callo ni condrogénesis en general.

3.3.2. Remodelación

La fase final del proceso de regeneración ósea se caracteriza por una remodelación del callo de fractura que va a permitir restaurar la forma y la función del tejido lesionado hasta obtener una estructura ósea biológica y biomecánicamente prácticamente indistinguible del estado previo a la lesión.

Al igual que sucedía con el proceso de reparación, en la fase de remodelación también intervienen un conjunto de células y señales moleculares interrelacionadas en tiempo y espacio que constituyen la unidad multicelular básica (**BMU**)⁵¹. El periodo durante el que actúan se denomina *sigma*, y como señalábamos en apartados anteriores permite comparar filogenéticamente los procesos de remodelación entre diferentes especies.

Gracias a una secuencia precisa de interacciones celulares, los osteoblastos y osteoclastos añaden o sustraen hueso para esculpir progresivamente el callo óseo hasta alcanzar la configuración biomecánica más favorable. Para iniciar este proceso es necesaria una señal activadora que puede ser: humoral (por ejemplo hormona paratiroidea), biomecánica (tensión) o una combinación de ambas.

Dicha señal activa a su célula efectora, en este caso los osteoblastos, induciéndoles a que abandonen la superficie ósea dejando espacio de esta forma a los osteoclastos. Éstos llegan a la zona libre de osteoblastos y se anclan por medio de uniones mediadas por integrinas, reabsorben un determinado volumen de hueso (hasta 5 μm por día) y por razones que aún no se conocen en profundidad, cesan su actividad y entran en ciclo de muerte celular programada^{52,56}.

A continuación, los osteoblastos son atraídos hacia la zona libre de osteoclastos, donde se anclan a líneas de cemento ricas en osteopontinas. Seguidamente comienzan a secretar una matriz osteoide que se distribuye en sábana desde la línea cementaria y

que progresivamente se calcificará formando las laminillas óseas. La matriz osteoide se produce a un ritmo de aproximadamente 1-2 μm por día. Durante el proceso de neoformación ósea, la mayor parte de osteoblastos mueren, otros se transforman en células de revestimiento y finalmente los restantes quedan atrapados en el interior de la matriz mineralizada transformándose en osteocitos que reestablecerán las redes de interconexión osteocitaria.

Podemos concluir, por tanto, que el proceso de remodelación está condicionado por el equilibrio entre las vías de activación-reabsorción-formación. El propósito de la combinación formación-remodelación ósea durante el crecimiento es el de alcanzar el máximo posible de resistencia del esqueleto con el mínimo de volumen/peso.

Durante la etapa adulta estos procesos combinados se encargarán de mantener esta resistencia, eliminando aquellas partes del hueso que estén dañadas y sustituyéndolos por hueso neoformado. De esta forma, la reabsorción ósea no es *per se* un proceso negativo siempre y cuando no sea excesivo o indiscriminado. Es más, si se produce una supresión prolongada de los mecanismo de reabsorción con terapias anti-resortivas (por ejemplo con bifosfonatos) se puede producir un acúmulo de microdaños, fracturas y disminución de la capacidad de regeneración ósea^{59,60}.

El osteocito desempeña un papel clave en la formación-remodelación ósea⁴⁸. Como comentamos anteriormente, los osteocitos son la estirpe celular más abundante en el tejido óseo con una densidad aproximada de 10.000 células por milímetro cúbico y 50 prolongaciones o procesos por célula³⁶.

Estas prolongaciones conectan los osteocitos unos con otros así como con las células de revestimiento de las superficies endosteales por medio de canales Haversianos y de Volkmann. Esta estructura, densamente entrelazada, permite que la red de osteocitos contacte con la práctica totalidad del hueso, con apenas varias micras de tejido óseo entre una laguna osteocitaria y otra⁶⁰.

Cuando se producen daños en los osteocitos (por microfracturas en el hueso, en los que se dañan las prolongaciones de los osteocitos en los canalículos, por deficiencia estrogénica y/o terapia corticoidea⁶¹) se puede inducir la apoptosis de los osteocitos. Independientemente del motivo de la apoptosis, los osteocitos muertos van a proporcionar la información topográfica necesaria para identificar la localización y tamaño del daño⁶².

Mientras que los fenómenos de reabsorción se producen en los componentes intracorticales y trabeculares del marco endóstico, las alteraciones que determinan su

activación (por ejemplo microfracturas) tienen lugar a mayor profundidad, en la matriz de osteonas o en el hueso intersticial entre osteonas en el caso del hueso cortical. Por otro lado, en huesos de estructura trabecular, estos fenómenos se producen entre hemiosteonas.

Por tanto, es fundamental que la información de las células apoptóticas de la profundidad se transmita a las células planas de revestimiento de la superficie endóstica para activar la formación del compartimento de remodelación ósea (BRC), que delimita y aísla la zona dañada con el fin de minimizar la pérdida de hueso sano⁶³.

Las células aplanadas de revestimiento son probablemente osteoblastos modificados (expresan marcadores de osteoblastos⁶³) que también expresan marcadores de factores de crecimiento y reguladores de osteoclastogénesis tales como RANKL, lo que sugiere que desempeñan un papel importante en la diferenciación de las células precursoras pluripotenciales de origen estromal. No obstante, por el momento se desconocen en detalle los fenómenos reguladores a este nivel.

Parece por tanto, que la apoptosis osteocitaria constituye uno de los primeros fenómenos que intervienen en la activación de la fase de remodelación. En este sentido, *in vivo* la apoptosis osteocitaria comienza al tercer día de inmovilización seguido al cabo de dos semanas por la fase de osteoclastogénesis⁶⁴.

In vitro se ha demostrado que la inducción de muerte celular sobre un cultivo celular de células MLO-Y4, mediante una herida lineal, provocaba la la formación de células TRACP positivas (osteoclast-like) a lo largo del surco realizado⁶⁵.

Desafortunadamente por el momento no es factible realizar estudios *in vivo* de la dinámica de una BMU desde su formación y actividad hasta su desaparición. Las

observaciones documentadas hasta el momento están basadas en “fotogramas” histomorfométricos y estudios *in vitro* de sistemas celulares⁶⁶.

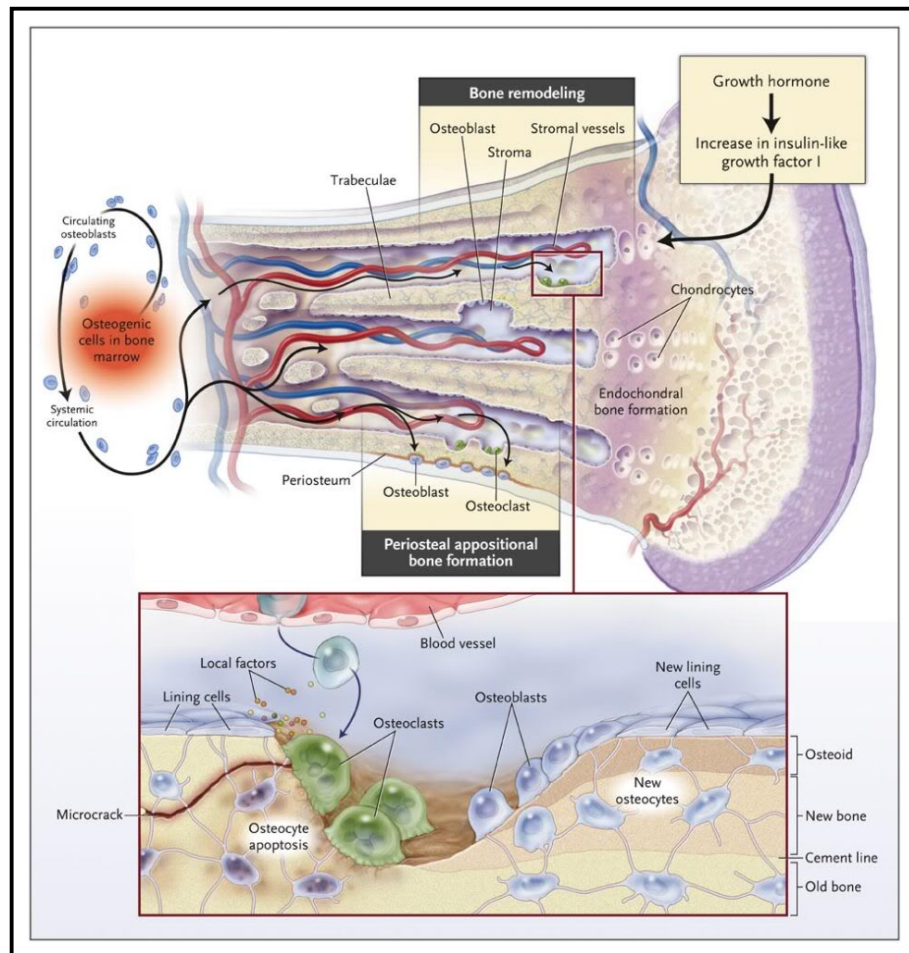


FIGURA 17. Representación esquemática de la Unidad Básica Multicelular (BMU) ósea. Se aprecia en la zona superior de la imagen el proceso de remodelado óseo en contraste con la zona inferior donde se está produciendo la formación ósea por aposición perióstica. En la parte inferior vemos a mayor aumento una representación esquemática de la BRC (Cámara de regeneración ósea) donde se aprecia la interrelación de osteoclastos, osteoblastos y osteocitos. Adaptado de Einhorn y cols⁵⁰.

4. FACTORES DE CRECIMIENTO UTILIZADOS EN REGENERACIÓN ÓSEA

A continuación estudiaremos los factores de crecimiento que con mayor frecuencia se utilizan en el ámbito de la regeneración ósea clínica o experimental. Comenzaremos con una descripción sobre las generalidades de los factores de crecimiento como moléculas

de señalización para profundizar a continuación en la estructura y función de: PDGF, IGF, TGF y BMP, factores que han sido intensamente estudiados por sus propiedades osteoinductivas.

La revisión de estos factores de crecimiento servirá, al igual que sucedía al estudiar la estructura del hueso, de soporte teórico para comprender el por qué de la capacidad osteogénica de la matriz ósea desmineralizada, objeto de estudio de la presente Tesis Doctoral.

4.1 GENERALIDADES

El término **Factor de Crecimiento (FC)** hace referencia a un grupo de polipéptidos de aproximadamente 6 a 45 KD de peso molecular, que están involucrados en la proliferación celular, diferenciación y morfogénesis de tejidos durante los periodos de embriogénesis, crecimiento postnatal y madurez^{4,67}.

Los FC pueden actuar como **mitógenos** en el sentido de que estimulan el crecimiento de ciertas estirpes celulares. Algunos de ellos son además **morfógenos**, ya que son capaces de cambiar el fenotipo de sus células diana. Ejercen su acción de forma autocrina (regulando a la propia célula secretora) y paracrina (actuando sobre las células vecinas). En algunos casos, se considera además que existe un efecto endocrino debido a los elevados niveles de éstos presentes en suero.

Los factores de crecimiento derivados del hueso son principalmente producidos por los osteoblastos, y durante la formación ósea son incorporados dentro de la matriz ósea. También pequeñas cantidades de factores sistémicos diluidos en el suero pueden quedar atrapados en la matriz ósea durante la mineralización. Otros tipos celulares, fundamentalmente derivados monocíticos como macrófagos y osteoclastos, también

producen una importante cantidad de factores de crecimiento, sobre todo durante la remodelación ósea y en las etapas iniciales de la reparación de fracturas⁵¹.

El modelo teórico más aceptado postula que estos factores quedan inactivos en la matriz cuando ésta se mineraliza, y se encuentran separados de las células efectoras hasta que el trauma o la remodelación fisiológica provocan la liberación en forma soluble de éstos. Una vez libres, los factores de crecimiento interaccionan con sus receptores celulares, y de este modo pueden regular el metabolismo de los osteoblastos y osteoclastos durante el proceso de remodelación ósea, e iniciar y controlar la respuesta del hueso ante el trauma^{68,69}.

Los factores de crecimiento óseo suponen menos del 1% de todas las proteínas no colágenas óseas, que a su vez son mucho menos abundantes que el colágeno del hueso, pero son los principales reguladores del metabolismo de las células óseas, y por tanto del hueso.

TABLA 2: DISTRIBUCIÓN DE FACTORES DE CRECIMIENTO EN EL HUESO

Factor de Crecimiento	Tamaño (kD)	Concentración en hueso (mg/kg)
TGF-β 1-5	25	200
BMP 1-12	16-30	2-5
PDGF AA, AB, BB	36	50
IGF-I, II	7,6	400
FGF-1,2	16-17	20

El efecto de los factores de crecimiento es mediado a través de receptores de superficie de las células diana, activando enzimas intracelulares fosforilativas, que como consecuencia de ello activan una cascada de señalización agregando co-factores y

proteínas que finalmente migran al núcleo celular. En conjunto, junto con diversos factores de transcripción activan una serie de genes que en última instancia producirán los cambios tanto en la actividad como en el fenotipo celular. *In vivo*, este mecanismo es de gran complejidad, estando regulado por subsistemas de *feed-back* o retroalimentación en los que participan otras enzimas, FC y proteínas receptoras^{51,69}.

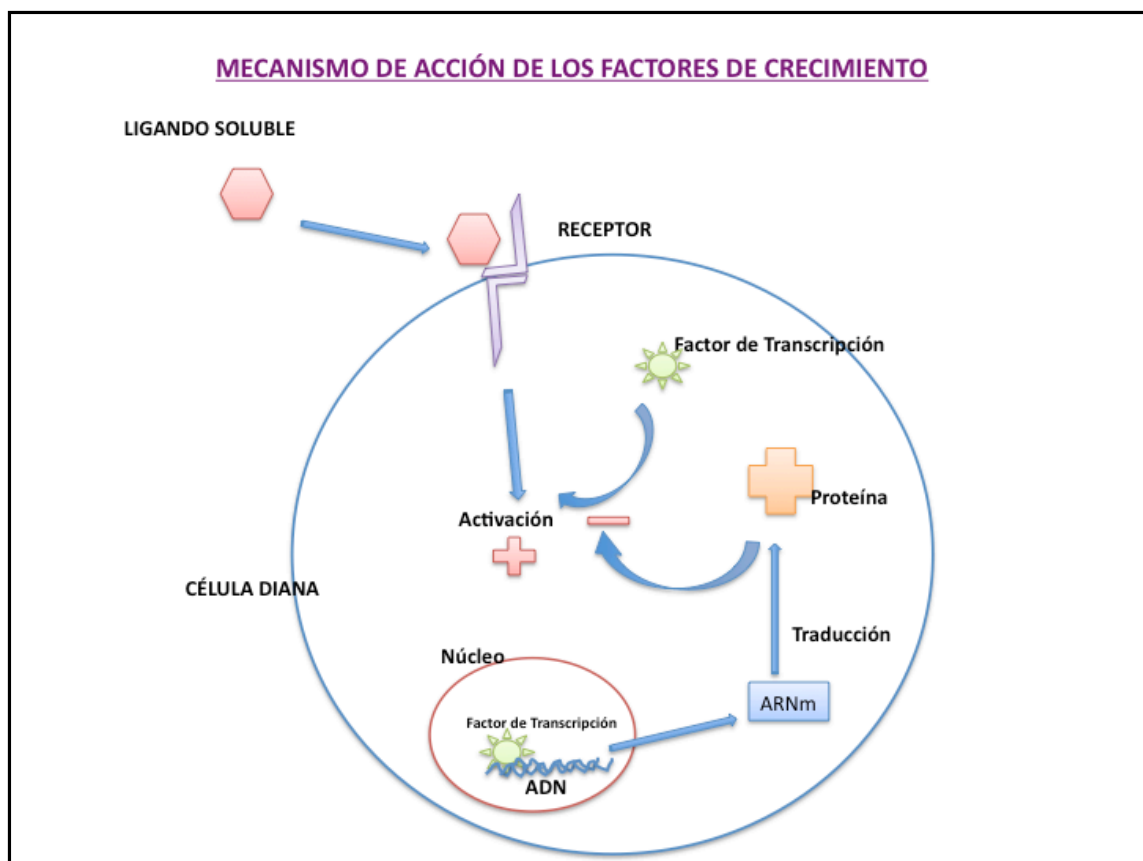


FIGURA 18. Esquema donde se representa el mecanismo de acción de los factores de crecimiento, al actuar un ligando soluble (GF) sobre un receptor determinado para inducir a su vez la activación de factores de transcripción que en última instancia determinarán la síntesis de proteínas que modificarán la morfología o función de la célula diana.

Los principales factores de crecimiento óseo son la superfamilia de los TGF- β (que incluye a los TGF- β propiamente dichos y las BMP entre otras), los IGF, los FGF y los PDGF. Todos estos factores, excepto las BMP, comparten la cualidad de inducir la multiplicación celular en determinados tipos celulares. Las BMP, por el contrario, son

casi exclusivamente factores de diferenciación, y tienen escaso o nulo efecto en la mitosis celular.

Se presenta a continuación una revisión bibliográfica de los principales factores⁶⁷⁻⁷² de crecimiento estudiados en el ámbito de la regeneración ósea :

- Familia de los TGF
- BMPs

4.2 FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE BETA (TGF –B)

4.2.1 Generalidades

La superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) constituye uno de los grupos de citoquinas más versátiles y más ampliamente distribuidos por el organismo ya que juegan un papel fundamental en la formación y desarrollo de diversos tipos de tejidos⁷².

Los TGFs son proteínas homodiméricas de 25 kD. Forman parte de la superfamilia de los TGF- β (FIG 19). En este grupo podemos encontrar más de 30 proteínas entre las que se incluyen: los propios TGFs, activinas, GDFs y las proteínas óseas morfogenéticas (BMPs).

El nombre de Factor de crecimiento transformante viene derivado del hecho de que los TGFs pertenecen a un grupo de reguladores del crecimiento. Inicialmente se aislaron en extractos tumorales y por ese motivo se pensó que inducían o mantenían a la “célula transformada”⁷³.

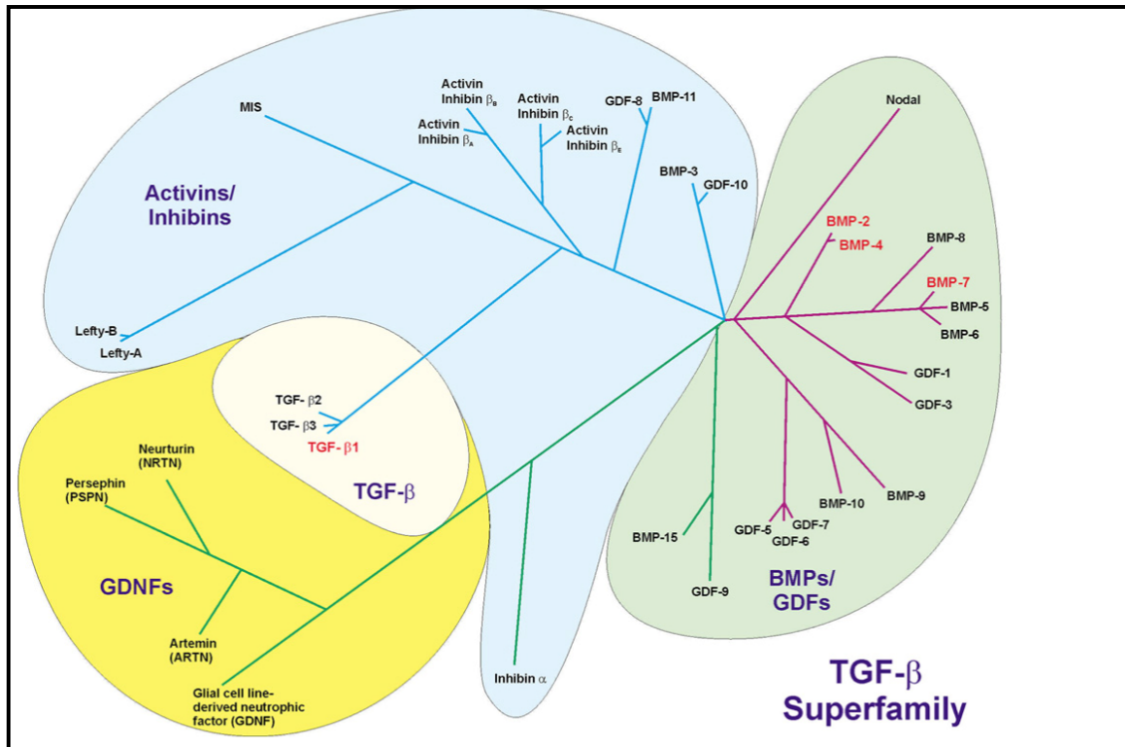


FIGURA 19. Dendrograma de la superfamilia del TGF- β , donde se aprecia la relación de los TGFs, Activinas/Inhibinas, BMPs y GDFs. Adaptado de <https://www.bioscience.org/2009/v14/af/3583/>

A pesar de que TGF β suprime la proliferación de células epiteliales, suele estar sobre-expresado en ciertas neoplasias epiteliales malignas. Por ejemplo, en el cáncer de próstata, las células tumorales, pierden sus receptores de TGF- β y adquieren resistencia frente al efecto anti-proliferativo de su ligando. La subsiguiente sobre-expresión de TGF como intento de compensación de este hecho, parece que en última instancia desencadena una potenciación del crecimiento tumoral⁷⁴.

Los TGFs son indispensables para el desarrollo normal del embrión. La pérdida de actividad de sus receptores provoca un aumento de la mortalidad perinatal⁷⁵. Además es importante para el desarrollo del sistema nervioso y juega un papel decisivo en la regulación de los precursores y en la diferenciación neuronal⁷⁶. Durante la embriogénesis, los diferentes efectos morfogénicos mediados por el TGF β son

regulados por un gradiente de concentraciones, de tal forma que diferentes genes son activados con diferentes umbrales de factor y por tanto aportan una información posicional que contribuye a la polaridad del embrión⁷⁷.

Este gradiente de concentraciones probablemente sea posible gracias a un mecanismo de regulación del tráfico intercelular. Ello se realiza vía receptor TGF β endocitosis y posterior recirculación del mismo^{76,77}. A pesar de todo, así como otros miembros de la superfamilia de TGF β , como la activina y las BMPs participan en las fases precoces de la embriogénesis (inducen la formación del mesodermo dorsal y ventral), el TGF- β por sí mismo, parece que desempeña un papel más importante en fases más avanzadas del desarrollo como en la fusión de las suturas craneales y en la regulación del crecimiento óseo craneal al estimular el crecimiento de la duramadre subyacente⁷⁸⁻⁸⁰. Ello se relaciona, como veremos posteriormente, con la necesidad de conservar intacta la duramadre durante el procedimiento quirúrgico de la craneotomía en rata.

Gran parte del conocimiento que se posee de los efectos *in vivo* de TGF- β , deriva de los estudios de mapeo de la expresión de TGF- β en tejido óseo y blando en ensayos experimentales regeneración⁸¹. Los TGF son secretados en forma de precursores (complejos latentes) que se activan tras ser liberados de las porciones N-terminales de su estructura molecular. El ligando secretado se une en primera instancia al complejo receptor de la superficie celular. Dicho complejo es en realidad un receptor transmembrana heterodimérico compuesto por dos subunidades. Tras unirse al ligando pone en marcha una cascada de señalización intracelular al activar un grupo de proteínas intracelulares (SMAD) gracias a su actividad serín-treonín y tirosín kinasa. Las proteínas SMAD fosforiladas actúan como componentes de los complejos transcripcionales, completando de esta forma el proceso de señalización celular^{82,83}.

Las denominadas SMADs reguladas por receptor, específicas para TGF- β son SMAD 2 y 3 (Figura 20), que se unen al Co-Smad (SMAD 4) para, posteriormente migrar al núcleo y activar un grupo específico de genes diana. Además, TGF- β induce la producción de otro factor de transcripción: Runx3, que forma un complejo con SMAD 3^{25,28}. Se ha visto que la acción coordinada de Runx3 y SMAD activadas por medio de BMPs, induce la diferenciación osteoblástica³⁰.

La actividad de TGF- β generalmente se potencia a través de alguna de las isoformas restantes. Así mismo la actividad de SMAD también se ve regulada por medio de conexiones con otras vías de señalización o factores de transcripción, entre ellas, tres vías distintas de MAP kinasas (ERK, p38 y JNK)³⁰.

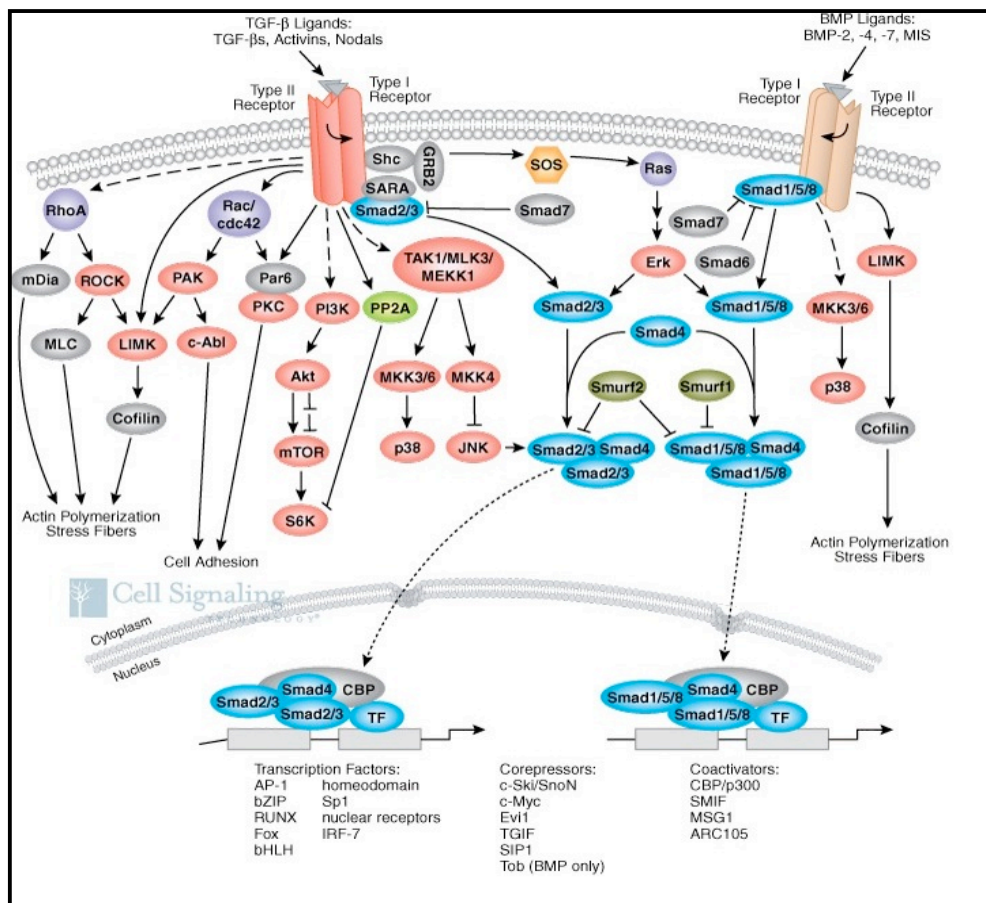


FIGURA 20. Representación esquemática de la vía de señalización de TGF- β (Smad 2/3) y BMP (Smad 1/5/8) y su relación con Smad4 y con los TF o Factores de Transcripción. Adaptado de http://www.stratech.co.uk/sino_biological/sino-biological-tgf-beta-signaling-pathway

Los TGFs son citoquinas con múltiples funciones. Entre ellas destacan: regulación del crecimiento, proliferación, adhesión y apoptosis sobre una importante variedad de células. *In vitro*, TGF- β estimula la contracción de colágeno, indicando con ello una potencial inducción de los fenómenos de fibrosis *in vivo*⁸³. Este efecto se ve incrementado por la acción conjunta de PDGF e IGF. No así con EGF, que al mismo tiempo disminuye la secreción de TGF- β a nivel cutáneo⁸⁴.

Los proteoglicanos de la superficie celular también son afectados de forma diferencial por TGF- β . En relación con ello, se ha demostrado que TGF- β es capaz de formar compuestos con diversos glicosaminglicanos y de esta forma desempeñar un papel importante en la regulación de las integrinas⁸⁵. Como consecuencia, es de gran importancia su efecto en el comportamiento celular en términos de adhesión, agregación y migración.

En general, TGF- β se une a células con estados de menor diferenciación en comparación con las BMP que suelen actuar sobre células más maduras. De esta forma, TGF- β ralentiza la maduración de los condrocitos presentes en la placa de crecimiento por medio del sistema SMAD 2 y SMAD 3⁸⁶.

TGF- β es capaz de incrementar la síntesis de matriz extracelular tanto en precursores óseos en modelos de rata como en células mesenquimales humanas⁸⁷. No es capaz, sin embargo, de incrementar la proliferación de estas estirpes. Un efecto similar se pudo comprobar al exponer condrocitos derivados de células madre humanas o de cartílago nasal al TGF- β ⁸⁸.

In vitro, TGF- β presenta un efecto bifásico sobre la replicación celular que depende tanto de la concentración de TGF- β , como de la densidad celular. Con altas concentraciones del factor de crecimiento, la síntesis de ADN se potencia de forma

continuada hasta que se alcanzan niveles críticos de densidad celular momento en el que cesa la actividad de TGF- β a pesar de su concentración en grandes cantidades²⁸. En la regulación de este efecto bifásico participan mecanismos del medio extra e intracelular. Respecto al primero parece que desempeña un papel relevante la Fetuina, componente no mineralizado del hueso. En el nivel intracelular, la cascada de señalización de TGF- β puede ser interrumpida, tras hiperactivación de la señalización de TGF- β y posterior defosforilación de SMAD, con la consiguiente acumulación en el citoplasma celular⁸⁹.

In vivo, TGF- β actúa como un potente inhibidor del crecimiento de diversas estirpes celulares y en particular de: células epiteliales, células endoteliales, células hematopoyéticas y linfocitos. En la regeneración de los tejidos blandos actúa como factor fibrogénico causando, contracción de las heridas y esclerosis tisular en hígado, riñón, pulmón y piel principalmente, amén de otros tejidos^{90,91}.

A nivel de los injertos óseos, TGF- β 1 desempeña un papel en la incorporación de los mismos, mientras que TGF- β 2 y β 3 son de menor importancia, en este sentido⁹¹.

4.2.2 Utilización en cirugía esquelética reconstructiva

Los efectos del TGF- β sobre la cirugía esquelética han sido ampliamente estudiados. Los resultados, sin embargo, son ambiguos en relación a su capacidad de potenciar la regeneración ósea. En un diseño experimental en el que se utilizaba TGF- β 1 en combinación con un *carrier* de carbonato cálcico en un modelo de defectos supraalveolares en mandíbulas de perro, se vio que no incrementaba de forma significativa la formación ósea⁹². Por el contrario, la adición simultánea de membrana + BMP + PDGF + bFGF utilizando como *carrier* un cemento reabsorbible si se correspondía con un aumento importante en la regeneración ósea del defecto⁹³. No

obstante, la administración en dosis única de TGF- β en defectos craneales de rata no estimulaba dicho proceso regenerativo⁹⁴.

A la luz de estos estudios, parece claro que el efecto estimulador del TGF- β sobre la regeneración ósea depende en gran medida del *carrier* usado así como de su cinética de degradación⁹⁵. Los *carriers* de hidrogel con un contenido del 90-95% de agua junto con TGF- β 1 tenían un efecto beneficioso sobre la regeneración de defectos óseos parietales, mientras que aquellos *carriers* con una velocidad de degradación demasiado rápida o demasiado lenta no tenían el mismo efecto⁹⁵. De esta forma se comprobó, en un modelo experimental de defectos parietales de tamaño crítico de conejo, que si bien la administración única de TGF- β no producía efecto alguno, cuando éste se combinaba con cápsulas de gelatina, sí se podía comprobar un aumento de la regeneración ósea^{96,97}.

La administración de TGF- β 1 junto con DBM (Matriz Ósea Desmineralizada) en un modelo de defectos segmentarios mandibulares en perros demostró diferencias significativas en la fortaleza del puente óseo respecto a los controles. Sin embargo, el incremento en la resistencia a la rotura respecto al lado sano era tan solo del 9,4%⁹⁸. El efecto osteogénico del TGF- β , depende de la existencia de células dedicadas a esa función. Experimentos en los que se prescindía del periostio en defectos críticos de cráneo de rata, no conseguían incrementos en la osteogénesis tras la administración de TGF- β ⁹⁹.

Por otro lado, parece que los efectos de TGF- β 1 (5 μ g) añadidos a 100 μ g de BMP-7 tenían un efecto potenciador en la formación de hueso en la cavidad abdominal de monos babuinos¹⁰⁰.

A pesar de estos efectos osteogénicos, la administración conjunta de TGF- β durante la colocación de implantes inmediatos en alveolos postextracción no demostró un

incremento en las tasas de osteointegración¹⁰¹. Resultados igualmente pobres fueron obtenidos en ensayos de regeneración periodontal¹⁰².

4.3 PROTEÍNAS ÓSEAS MORFOGENÉTICAS (BMPS)

4.3.1.Generalidades

Las proteínas óseas morfogenéticas (en adelante BMPs) son factores de crecimiento multifuncionales que pertenecen a la superfamilia del factor transformante beta. Estructuralmente, las BMPs son proteínas homodiméricas de aproximadamente 30 kD con dos cadenas idénticas unidas por puentes cisteína.

Actualmente hay caracterizados 15 miembros de este grupo (Tabla 3). A excepción de la BMP-1 (proteasa que actúa durante el desarrollo embrionario), todos pertenecen a la superfamilia de la TGF- β y comparten una homología con éste del 40 al 50%^{103,104}. En concreto TGF- β y BMP-2 presentan una estructura similar con el puente de cisteína y las dos cadenas plegadas en hoja β ¹⁰⁵. Nos centraremos en el estudio de BMP-2, BMP-4 y BMP-7 (proteína osteogénica 1, *OPI*), consideradas osteogénicas y que como tales han sido utilizadas en un número importante de estudios clínicos y experimentales.

Las BMP se encuentran en la matriz ósea en cantidades del orden de microgramos por kilogramo de tejido óseo. Las BMP son consideradas morfógenas, es decir, son moléculas capaces de determinar la formación de diversas estructuras por medio de la constitución de campos morfogenéticos basados en gradientes de estímulos de mayor o menor complejidad sobre el genoma^{60,103,104}. Como tales morfógenos, desempeñan lógicamente un papel fundamental en el desarrollo embrionario estando involucradas en la inducción del mesodermo y de los brotes de las extremidades¹⁰⁵. Así, participan también en el desarrollo de riñones, ojos, neuronas cerebrales, testículos, piel, corazón y dientes. Para ello, y al igual que sucedía con TGF- β difunden a lo largo de gradientes

de concentración para inducir las diferentes fases del desarrollo. Un ejemplo de ello es el desarrollo de las articulaciones en el feto. En este modelo de morfogénesis, la regulación del gradiente de concentraciones/efectos es llevada a cabo por proteínas supresoras o antagonistas como la cordina, noggina, proteínas pertenecientes a la familia DAN (*cerbero*, *caronte*, *gremlin*, DAN) e indirectamente por metaloproteasas¹⁰⁶.

Algunas de estas proteínas son liberadas en los denominados campos morfogénéticos donde al mismo tiempo se produce una regulación por medio de patrones específicos de transcripción de los complejos *homebox* (*hox*), como sucede por ejemplo en la formación de las extremidades¹⁰⁷. En este complejísimo proceso de morfogénesis, hay diversos factores que también contribuyen a regular las funciones de las BMPs, tales como *indian hedgehog* (*ihh*) o *sonic hedgehog* (*shh*). Una gran parte de estas moléculas están interconectadas por medio de circuitos de feedback. Tienen una función reguladora dual: como moduladores a distancia creando gradientes de concentraciones o como moduladores locales al inducir BMPs para el desarrollo embriológico^{108,109}.

La actividad de las BMP se realiza a través de un receptor transmembrana heteromérico de la superficie celular, cuya estructura es idéntica al del TGF- β . La diferencia en las vías de señalización de ambos receptores recae en las proteínas SMAD que son activadas por las BMPs (Figura 20). Esta vía se inicia con la fosforilación de SMAD 1, 5 y 8 que a continuación agregan SMAD 4 para posteriormente dirigirse al núcleo celular¹¹⁰. SMAD 6 y 7 inhiben este proceso de señalización, tanto para las BMPs como para TGF- β en el marco de complejos procesos de regulación. Un ejemplo de este tipo de procesos tiene lugar en el desarrollo del cartílago maduro para, de esta forma, contribuir al proceso global de morfogénesis que tiene lugar en la formación del hueso endocondral. Dicho proceso es además mediado por diversos factores de transcripción como *cbfa1* (*Runx2*), que como ya vimos anteriormente, desempeña un papel

fundamental en la diferenciación condrocítica y en la osificación^{28,111}. Además está asociado con la regulación de genes promotores osteoblásticos como la osteocalcina.

Como se describió en el apartado 3.2.1, la formación del hueso endocondral se basa en la coordinación espacio-temporal de la diferenciación de células mesenquimales indiferenciadas en condrocitos, posterior vascularización y finalmente diferenciación en osteoblastos. Durante este proceso, numerosas señales reguladoras exógenas, codificadas por factores de transcripción específicos, son depositadas en la matriz extracelular¹¹². Otros factores relacionados con la expresión de genes dependientes de BMPs son por ejemplo la familia de proto-oncogenes *fos-jun*¹¹¹.

La regulación negativa de la actividad de BMP tiene lugar en el nivel extracelular por medio de un gran número de cofactores y citoquinas. Por ejemplo, altas concentraciones de TGF- β suprimen la diferenciación osteoblástica. Asimismo, factores pertenecientes a la familia de los glicoproteos parecen modular la intensidad de la señalización de BMPs en la superficie celular. Siguiendo con esta línea de regulación negativa de BMP, se ha demostrado *in vitro* que TNF- α es capaz de inhibir la vía de diferenciación osteoblástica iniciada por BMPs¹¹³.

Las BMPs no estimulan la proliferación celular de células mesenquimales *in vitro* sino que estimulan la producción de matriz extracelular con un aumento de los niveles de fosfatasa alcalina y de colágeno tipo I. Esto demuestra que tal y como decíamos anteriormente, las BMPs actúan como morfógenos y no como mitógenos sobre células mesenquimales indiferenciadas. Es decir, inducen la diferenciación en un fenotipo osteoblástico pero no estimulan su replicación. Por otro lado, algunos factores como BMP-2 también son capaces de estimular la osteoclastogénesis *in vitro* activando a la ciclo-oxigenasa 2 (COX-2)¹¹⁴.

Finalmente, la administración *in vivo* de BMP provoca la formación de un armazón de matriz extracelular y el reclutamiento de células mesenquimales indiferenciadas, con efectos quimiotácticos sobre los osteoblastos así como sobre los osteoprogenitores de la médula ósea humana¹¹⁵.

TABLA 3. SUBFAMILIAS DE PROTEÍNAS ÓSEAS MORFOGENÉTICAS (BMP)¹¹⁵

NOMBRE DE SUBFAMILIA	BMP	FUNCIÓN
Proteinasa de Procolágeno C	BMP-1	Colagenasa
BMP-2A	BMP-2	Osteoinducción, condrogénesis, osteogénesis
Osteogenina	BMP-3	Modulación de la actividad de BMP-2
BMP-2B	BMP-4	Osteoinducción, condrogénesis, osteogénesis
BMP-5	BMP-5	Osteoinducción, condrogénesis, osteogénesis
Vgr-1 (Vegetal-Related 1)	BMP-6	Osteoinducción, condrogénesis, osteogénesis
OP-1	BMP-7	Osteoinducción, condrogénesis, osteogénesis, nefrogénesis
OP-2	BMP-8	Osteoinducción, condrogénesis, osteogénesis, espermatogénesis, desarrollo placentario
OP-3	BMP-8B	Osteoinducción, condrogénesis, osteogénesis
GDF-2	BMP-9	Hepatogénesis, osteoinducción
BMP-10	BMP-10	Osteogénica?
GDF-11	BMP-11	Osteogénica?
GDF-7; CDMP-3	BMP-12	Condrogénica?
GDF-6; CDMP-2	BMP-13	Condrogénica?
GDF-5; CDMP-1	BMP-14	Condrogénica?
BMP-15	BMP-15	Osteogénica?

4.3.2 Utilización en cirugía esquelética reconstructiva

La mayor parte de los estudios publicados se centran en la administración de dosis únicas de BMP, utilizando diversos *carriers* como: fosfatos cálcicos, hueso bovino desproteinizado, o titanio, con el fin de evitar los fenómenos de proteólisis y disolución¹¹⁶⁻¹²⁰. Generalmente las BMP se cargaban en los *carrier* mediante adsorción de la superficie de los mismos. Esto producía en casi todos casos una dilución y lavado del factor de crecimiento en las primeras 24 horas. Algunos autores con el fin de minimizar este efecto utilizaron una mezcla de gelatina y colágeno, para rellenar los poros del *carrier*¹²¹. Sin embargo, son pocos los diseños experimentales que han sido capaces de obtener liberación sostenida del BMP a largo plazo, generalmente con *carriers* compuestos por polímeros reabsorbibles^{121,122}. Otros abordajes, han utilizado como *carriers* hueso desmineralizado, como DBX o coágulos autógenos¹²³.

Inicialmente, en un amplio porcentaje de los diseños experimentales en los que se utilizaban BMP no era posible calcular la dosis efectiva de factor de crecimiento que permanecía en el *carrier* tras la aplicación del primero, pero sí que se constataba que la dosis administrada oscilaba entre 10 ng y 1 mg. Ello implica que en un gran número de estos estudios existe una sobredosificación respecto a los niveles fisiológicos de BMP (aproximadamente 1 microgramo/ kg de hueso) así como a los niveles requeridos para inducir osteogénesis *in vivo* (aproximadamente 300 ng)¹²⁴. A pesar de ello, en la mayor parte de estudios, rhBMP2, rhBMP4 y rhBMP7 inducían la formación de hueso ectópico u ortotópico de forma dosis-dependiente. Ello demostró que incluso con tasas altas de aclaramiento del factor, la inducción inicial de la cascada de morfogénesis ósea era suficiente para inducir la regeneración en defectos óseos de diversos modelos experimentales¹²⁵⁻¹²⁸.

En la actualidad la mayor parte de los estudios se centran en la combinación de Quitosán[3] como *carrier* y rh-BMP-2¹²⁸. En este sentido, los resultados obtenidos en animales en parámetros tanto de formación ectópica de hueso, incremento de la mineralización y eficacia en modelos de fracturas sin consolidación utilizando rhBMP-2 son positivos^{129,130}.

Estudios experimentales de elevación de seno maxilar para cirugía preprotésica implantológica con BMP2 y BMP7 muestran resultados variables en función del *carrier* utilizado. En general, la cantidad de hueso formado es significativamente mayor respecto al lado control¹³¹. Sin embargo, los *ratios* de osteointegración de implantes insertados en estas localización no siempre se incrementaban^{132,133}. Sí se ha visto, que si bien la adsorción de BMP-7 en la superficie del implante aumentaba la formación de hueso peri-implantario en fases iniciales, a largo plazo se equiparaba con los sitios no tratados^{134,135}.

Actualmente, se dispone de dos BMP recombinantes para uso clínico en humanos, rhBMP-2 y rhBMP-7(OP-1). Ambas han sido evaluadas en estudios controlados, aleatorizados, de pacientes traumatológicos(nivel I). Un gran estudio prospectivo de Friedlaender y cols¹³⁶, aleatorizado, controlado, parcialmente ciego, multicéntrico, evaluó la eficacia del OP-1 Device® (3,5 mg de rhBMP-7 en un vehículo de administración de partículas de colágeno de tipo 1 derivado de hueso bovino; *Stryker Biotech, Hopkinton, Massachusetts*) respecto de la del autoinjerto, en el tratamiento de pseudoartrosis tibiales. Obtuvieron resultados similares en ambos grupos por lo que los autores concluyeron que la OP-1 era una alternativa segura y eficaz al injerto óseo para el tratamiento de pseudoartrosis tibiales. Otro efecto positivo del empleo de OP-1 fue que se observó una reducción de la tasa de infecciones respecto de la del grupo de referencia.

³ **Quitosán:** Biopolímero (poli-N-acetil glicosaminoglicano) derivado de la quitina que en los últimos años ha sido utilizado en diseños experimentales de ingeniería tisular como sustituto óseo con resultados prometedores.

Más recientemente, el Grupo de estudio para Evaluación de la BMP-2 en la cirugía de traumatismos tibiales (BESTT, por su sigla en inglés) comunicó los resultados de un gran estudio controlado, multinacional, prospectivo y aleatorizado sobre los efectos de INFUSE® (rhBMP-2 sobre una esponja de colágeno de tipo 1 absorbible; *Medtronic Sofamor Danek, Memphis, Tennessee*) en el tratamiento de fracturas expuestas de tibia¹³⁷. El grupo tratado con la dosis más alta de rhBMP-2 (1,5 mg/kg) presentó menos intervenciones secundarias y aunque no se los empleó como criterios de valoración primarios, también se observó aceleración del tiempo hasta la consolidación, mejor cicatrización de la herida y menor tasa de infección.

McKee et al¹³⁸ investigaron, en un estudio similar, el uso de OP-1 para el tratamiento de fracturas expuestas de tibia. Se observó una disminución significativa de la tasa de intervenciones secundarias por retraso de la consolidación y pseudoartrosis en el grupo tratado con OP-1 ($p = 0,02$).

No obstante recientemente han sido publicadas dos interesantes revisiones donde si bien no se cuestiona la eficacia de las BMP en la regeneración ósea en términos absolutos, sí se plantean grandes interrogantes respecto a la implicación de grandes intereses económicos en el diseño y realización de los estudios con BMP, con los consiguientes sesgos derivados de ello¹³⁹⁻¹⁴³.

De la presente revisión bibliográfica se pueden extraer ciertas conclusiones:

- De todos los factores de crecimiento disponibles, PDGF, TGF- β , IGF, BMPs y FGF parecen ser los más efectivos en regeneración-reconstrucción ósea.
- TGF- β ha demostrado diversidad de efectos en estudios experimentales. El principal papel del TGF en regeneración ósea es la síntesis de matriz extracelular ósea sin inducción de las fases finales de diferenciación en la línea celular osteoblástica.

- BMPs y especialmente, BMP-2, BMP-4 y BMP-7, parecen ser los factores de crecimiento de mayor utilidad en regeneración ósea del área maxilofacial aunque por el momento Las dosis y los *carrier* más adecuados no están del todo establecidos. La utilización de las variantes recombinantes humanas, rhBMP-2 y rh-BMP-7 en ensayos clínicos en humanos está mostrando datos muy prometedores y con toda probabilidad la investigación clínica en regeneración ósea se centrará en los próximos años en estos dos factores¹⁴⁴.

5.MATRIZ ÓSEA DESMINERALIZADA

La matriz ósea desmineralizada (DBM) es un término que engloba todos aquellos dispositivos médicos caracterizados por ser biomateriales disponibles comercialmente con capacidad osteoinductiva y osteoconductiva. En términos generales son matrices orgánicas extraídas en su mayoría de huesos humanos de donante. Contienen la mayor parte del componente proteico del hueso nativo así como pequeñas cantidades de apatitas, fosfatos inorgánicos y trazas de residuos celulares. Muchos de los componentes proteicos de las DBM (por ejemplo los FC) han demostrado su potencial osteogénico¹⁴⁵.

Disponibles comercialmente en forma de pasta, gel, hojas o fragmentos flexibles , la DBM aporta una matriz biodegradable que, cuando se aplica en defectos óseos, permite la liberación endógena de los componentes proteicos osteogénicos induciendo teóricamente la formación de nuevo hueso y acelerando el proceso de curación.

Para entender la importancia del papel actual de la DBM en la Cirugía regenerativa ósea no hay más que analizar las cifras de consumo de DBM en procedimientos ortopédicos. Así, se calcula que del total de procedimientos de injerto óseo que tienen

lugar anualmente en el mundo (aproximadamente unos 500.000 con un coste aproximado de 5.000 millones de dólares), en un 20% se utiliza DBM.

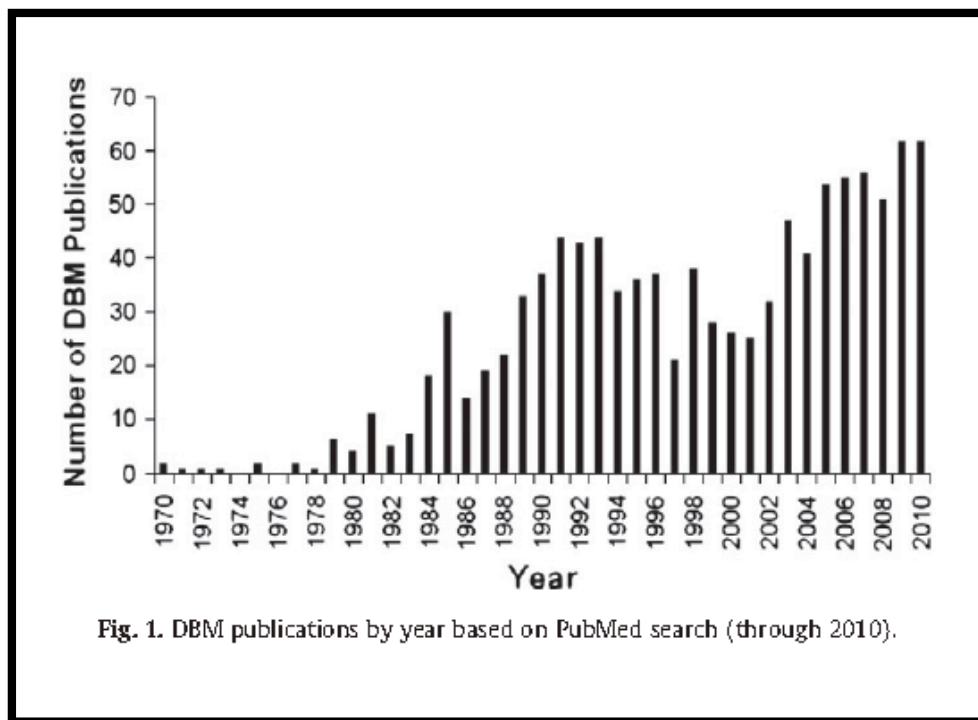


FIGURA 21. Número de publicaciones anuales en Pubmed que contienen el término DBM hasta 2.010. Gruskin et al¹⁴⁶.

En términos de investigación en el campo de la DBM, si atendemos al número de publicaciones en Pubmed en los últimos 20 años conteniendo el término DBM, podemos comprobar que existe un interés constante en la búsqueda de aplicaciones clínicas de la matriz ósea desmineralizada¹⁴⁶.

La existencia de numerosas presentaciones comerciales de DBM junto con las teóricas prestaciones “extraordinarias” de cada producto promocionadas por las compañías manufactureras plantean numerosas dudas en cuanto a su verdadero potencial, relación coste/efectividad, bioseguridad, etc.

Por otro lado, como veremos posteriormente hay una serie de factores que afectan de forma significativa a la capacidad reparativa de la DBM como: técnicas de obtención de

la matriz de sujetos donantes, edad y género del donante y composición y propiedades de la DBM. Para poder analizar en profundidad los efectos de la DBM es fundamental dominar el concepto de Osteoinducción.

5.1 OSTEOINDUCCIÓN

La osteoinducción es el fenómeno por el cual el material implantado desencadena la aparición de hueso en un tejido en un principio no comprometido hacia la estirpe ósea. Para ello, las células precursoras pluripotenciales mesenquimales deben ser inducidas hacia la diferenciación osteoblástica^{145,147}.

Los modelos experimentales de estricta osteoinducción deben eliminar el posible efecto meramente osteoconductor del material que se evalúa. Para demostrar sin dudas la capacidad osteoinductiva de un material, debe ser implantado en lechos extraesqueléticos, bien subcutáneos o intramusculares¹⁴⁷.

El fenómeno de osteoinducción se produce preferentemente por los injertos óseos autólogos; los materiales como el hueso desmineralizado, que contienen BMP y otros factores de crecimiento; y los propios factores de crecimiento, que inducen a las células dianas para que proliferen y se diferencien hacia el fenotipo osteoblástico, incluso ectópicamente. Depende fundamentalmente de tres factores: la acción aislada o combinada de ciertos factores de crecimiento, la existencia de las células diana, y la presencia de un sustrato adecuado.

5.2 ANTECEDENTES HISTÓRICOS

En 1.668, el cirujano holandés Job Van Meek'ren¹⁴⁸, realizó el primer transplante de hueso xenogénico, transplantando el hueso de calota de un perro a un soldado ruso que había sufrido un traumatismo craneal severo. Paradójicamente el injerto fue exitoso pero

por el miedo a la excomunión, el cirujano debió retirar el mismo. Desde entonces las técnicas quirúrgicas de recolección y utilización de los injertos óseos (autólogos, heterólogos y xenogénicos) han evolucionado en progresión geométrica hasta nuestros días. En la actualidad, se calcula que los trasplantes de hueso autólogo son diez veces más frecuentes que los de cualquier otro órgano transplantable¹⁹⁹.

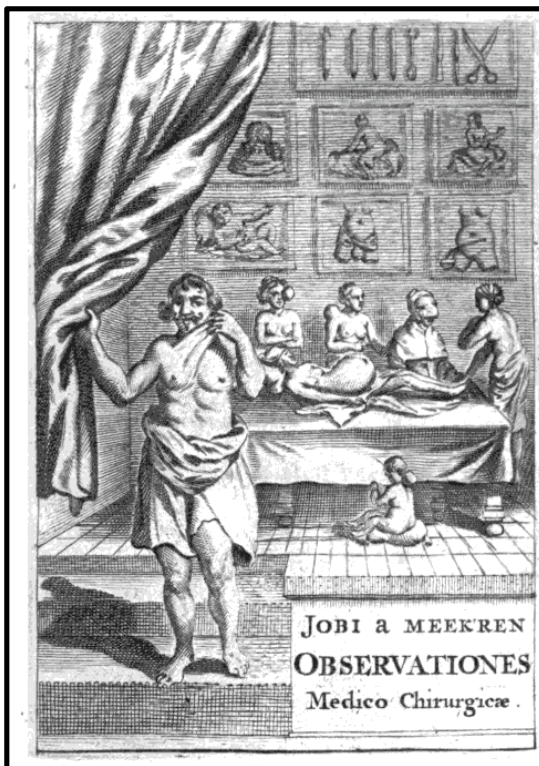


FIGURA 22. Portada del Tratado Médico-Quirúrgico de Job Van Meek'ren donde se describe por primera vez la técnica del trasplante xenogénico.

El estudio del fenómeno de inducción ósea u osteoinducción tuvo sus orígenes en 1.889 con la utilización por primera vez de la matriz ósea desmineralizada. En ese año, Senn¹⁴⁹ implantó hueso bovino desmineralizado con ácido muriático (como vehículo para la administración de antisépticos) en 10 pacientes con osteomielitis y en 14 perros con defectos óseos en el cráneo, informando de un inequívoco aumento de la reparación ósea y considerando a la matriz como un buen soporte para el crecimiento óseo. En 1.890,

Miller¹⁵⁰, siguiendo las técnicas de Senn, rellena una cavidad en la metafisis proximal de la tibia, residual a una osteitis crónica previamente desbridada, con hueso de costilla de buey descalcificado con ácido clorhídrico y reducido a virutas.

A raíz de estos dos estudios se desarrolló un gran interés entre los cirujanos ortopédicos de la época en el campo de la inducción ósea. Bier¹⁵¹, Leriche¹⁵² se dedicaron al estudio del origen de la misma negando la necesidad de intervención de células específicas y con ello inauguraron una nueva era en el concepto de la regeneración tisular.

Durante la Primera Guerra Mundial (1.914-1.917) se estimuló la búsqueda de técnicas efectivas de autoinjerto para el tratamiento de las heridas de guerra. En este contexto, Phemister¹⁵⁴ y Groves¹⁵³ estudiaron de forma sistemática los autoinjertos utilizando modelos animales preclínicos. Introdujeron el concepto de “creeping substitution” según el cual el hueso receptor crece en el interior del hueso injertado.

La nomenclatura actual define este concepto como Osteoconducción, término acuñado por Urist y que posteriormente desarrollaremos. Groves enfatizó la importancia de la “fijación estable” del injerto en el lecho receptor y de la utilización de hueso fresco.

Bier¹⁵¹ afirmó que para la formación del tejido óseo no era necesario la intervención de una célula ósea específica u osteoblasto, sino que las células que constituían el sincitio del tejido conjuntivo en su fase embrionaria eran pluripotenciales y por tanto, capaces de originar los más diversos tejidos procedentes de la misma hoja embrionaria, cuando a ello son inducidas por determinadas sustancias (que se denominaron “hormonas de Bier”).

Aunque a nivel de la literatura internacional no existió una gran divulgación de los trabajos del Prof. Martín Lagos, este autor publicó en 1.946 en nuestro país una serie de

minuciosos artículos^{172,173} sobre la inducción ósea, bajo el título de "Obtención experimental de hueso metaplásico" realizados en el Instituto de Medicina Experimental de Madrid. Realizaba una inyección de extractos alcohólicos de hueso autólogo en el músculo recto anterior de conejos, con el fin de dilucidar hasta qué punto podía influir en la formación de hueso heterotópico la presencia de este extracto. De estas experiencias dedujo que no era precisa la presencia de ningún extracto óseo para la formación de hueso, llegando a afirmar en sus conclusiones que *"el hueso se forma a expensas de células mesenquimatosas con potencia prospectiva ósea, que permanecen indiferentes hasta que el medio en que existen se modifica, en condiciones favorables a su desarrollo evolutivo"*.

Es en estos años, cuando surgió la duda de cómo podría determinarse si la formación ósea, tras el trasplante de un tejido, era debida a proliferación y actividad osteogénica de las células trasplantadas, o si bien, eran las células del huésped, por la inducción del tejido trasplantado, las responsables de la aparición del nuevo hueso.

No fue hasta 1.947 cuando Lacroix en la revista Nature ofreció una explicación a dicho proceso afirmando que el hueso contiene sustancias que inician y permiten la osteogénesis y las denominó osteogeninas.

Ray y col. en 1.957¹⁵⁶, trabajando sobre defectos de calota craneal en ratas, llegan a la conclusión de que la matriz ósea desmineralizada en ácido etilén-diamino-tetraacético (EDTA) rellena los defectos óseos de forma más completa que el hueso autólogo congelado y el hueso desproteinizado (estructura inorgánica).

En 1.965¹⁵⁷, Marshall Urist, Cirujano Ortopédico estadounidense publicó en la revista *Science* los resultados de su experimentación con matriz ósea alogénica desmineralizada donde se recogieron los resultados de más de 70 experimentos en los que estudiaron más de 300 animales que incluyeron ratas, conejos y perros. Se realizaron medidas semi-cuantitativas con las que se pudo extraer un porcentaje de éxito en términos de formación ósea ectópica, cercano al 90%. Estos resultados aportaron la evidencia indiscutible de nueva formación ósea por inducción considerándose de esta forma la primera referencia científica validada sobre la utilidad de la matriz ósea desmineralizada en la formación de hueso ectópico.

Además una de las grandes aportaciones de el estudio del Prof. Urist fue establecer un modelo animal (rata atímica) que ha permanecido durante años como el patrón oro para testar la capacidad de los diversos injertos de formar hueso *de novo*. Por otro lado, en el mismo documento se detallaba de forma pormenorizada el procedimiento completo para obtener un aloinjerto óseo capaz de mantener propiedades “autoinductivas”.

Urist sospechaba que esta matriz servía como superficie para la migración, interacción y proliferación de las nuevas poblaciones celulares¹⁵⁸. También pensaba que la matriz ósea inducía la síntesis de una enzima específica para la rotura de las uniones covalentes de la estructura del colágeno. Posteriormente, descartaría estas teorías¹⁵⁹.

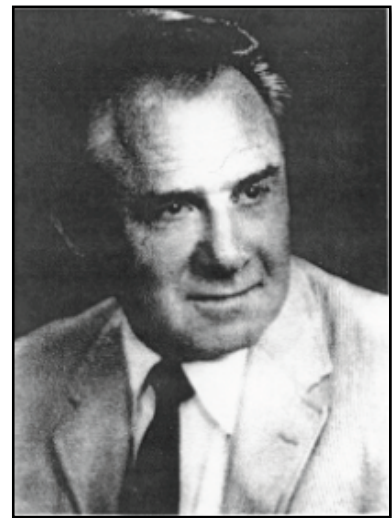


FIGURA 23. Fotografía del Prof. Marshall R. Urist tomada en 1.965.

Bone: Formation by Autoinduction

Abstract. Wandering histiocytes, foreign body giant cells, and inflammatory connective-tissue cells are stimulated by degradation products of dead matrix to grow in and repopulate the area of an implant of decalcified bone. Histiocytes are more numerous than any other cell form and may transfer collagenolytic activity to the substrate to cause dissolution of the matrix. The process is followed immediately by new-bone formation by autoinduction in which both the inductor cells and the induced cells are derived from ingrowing cells of the host bed. The inductor cell is a descendant of a wandering histiocyte; the induced cell is a fixed histiocyte or perivascular young connective-tissue cell. Differentiation of the osteoprogenitor cell is elicited by local alterations in cell metabolic cycles that are as yet uncharacterized.

New evidence in favor of the theory of induction can be gathered from the process of bone formation in the interior of an implant of acellular, devitalized, decalcified, bone matrix. Differing from previous demonstrations of induction systems, which produce scanty deposits and less than 30-percent positive results (1), decalcified bone yields new bone in an amount proportional to the volume of the implant; the percentage of positive experimental results is as high as over 90 percent. The results of some 70 experiments on approximately 300 animals are summarized below to intro-

duce a hypothesis of postfetal osteogenesis by autoinduction (2).

Long bones, excised from adult rabbits and other laboratory animals, were cut in lengths of 1 to 2 cm and decalcified, unfixed, in 0.6N HCl. Samples of human cortical bone obtained from accident cases, excised under aseptic conditions at autopsy, were lyophilized and decalcified similarly in sterile solutions of 0.6N HCl for a period of 5 days. The acid was removed by prolonged washing in sterile 0.15M NaCl. The chemical composition of HCl-decalcified bone matrix, in millimoles per liter, per kilogram,

893

Table 1. Bone formation in implants of decalcified bone matrix.

Donor	Preparation	Site	Host	Positive results (%)
Mouse	HCl, 0.6N	Rectus abdominus	Mouse	95
			Rat	60
Rat	HCl, 0.6N	Rectus abdominus	Rat	90
			Rabbit	70
Guinea pig	HCl, 0.6N	Rectus abdominus	Guinea pig	95
			Rat	50
Rabbit	HCl, 0.6N	Rectus abdominus and quadriceps	Rabbit	98
			Rat	60
Calf	HCl, 0.6N	Rectus abdominus	Rabbit	50
			Rat	60
Rabbit	EDTA, 1N	Rectus abdominus	Rabbit	80
Rabbit	Formic-citric, 1N	Rectus abdominus	Rabbit	85
Rabbit	Lactic, 0.6N	Rectus abdominus	Rabbit	10
Rabbit	Acetic, 0.6N	Rectus abdominus	Rabbit	50
Rabbit	Nitric, 0.6N	Rectus abdominus	Rabbit	0
Rabbit	Nitrous, 0.6N	Rectus abdominus	Rabbit	0
Rabbit	β -Propionolactone, 10%	Rectus abdominus	Rabbit	0
Rabbit	HCl, 0.6N, + 0.1% toluidine blue	Rectus abdominus	Rabbit	80
Rabbit	HCl, 0.6N, + 70°C heat	Rectus abdominus	Rabbit	20
Rabbit	HCl, 0.6N, + 70% alcohol	Rectus abdominus	Rabbit	85
Rabbit	HCl, 0.6N, + lyophilization	Rectus abdominus	Rabbit	80
Rabbit	HCl, 0.6N, + 0.1% 1,2-fluorodinitrobenzene	Rectus abdominus	Rabbit	0
Rabbit	HCl, 0.6N, + 0.1% iodoacetamide	Rectus abdominus	Rabbit	10
Rabbit	CaCl ₂ , 25 mmole/liter	Rectus abdominus	Rabbit	50
Rabbit	HCl, 0.6N	Ulna	Rabbit	95
Human	HCl, 0.6N	Various bone defects	Human	90
Calf	HCl, 0.6N	Fibrous dysplasia	Human	
Calf	HCl, 0.6N	Lumbar spinal fusion	Dog	50

FIGURA 24. Extractos del Artículo clave en el estudio de la Regeneración Ósea del Prof. Urist, publicado en la revista Science en 1.965¹⁵⁷.

En 1.967 Urist et al publicaron un nuevo trabajo titulado *The Bone Induction Principle* en el que ya, de una forma clara, inclinándose por la teoría de Bier, hacen alusión a una "sustancia" que sería la causante del mecanismo de inducción ósea y que ellos llaman "Principio de Inducción Ósea" (B.I.P.)¹⁵⁷, describiendo el proceso de inducción ósea de la siguiente forma: "Cuando la diferenciación celular se atribuye a los efectos físicoquímicos de un tejido sobre y en contacto con otro, el mecanismo se conoce como "inducción". Cuando un tejido transmite el B.I.P. (una entidad compleja de carácter desconocido), produce diferenciación a osteoblastos y el proceso se llama "inducción ósea"². El sistema de inducción ósea se compone de células inductoras y células de respuesta. Una célula inductora es aquella que ha tenido contacto con el B.I.P. e induce a una célula de respuesta a diferenciarse en osteoblasto. La célula de respuesta es habitualmente una célula mesenquimal hipertrofiada perivascular y deviene en célula inducida cuando se diferencia en osteoblasto, condroblasto o hematocitoblasto".

A pesar de estos avances, persistía el mismo interrogante: ¿qué componente de la matriz ósea desmineralizada es el que producía el estímulo para que aconteciera el fenómeno de inducción ósea? Esta pregunta obsesionaría a Urist durante un largo período de tiempo, dirigiendo todas sus investigaciones hacia la búsqueda y caracterización de dicho componente.

El Dr. Urist continuó estudiando diversas variantes de matriz ósea desmineralizada con mayor o menor grado de calcificación, concluyendo que los mejores resultados obtenidos se relacionaban con la utilización de aloinjertos de matriz ósea totalmente desmineralizada.

En 1971 la revista especializada *Journal of Dental Research* recogió las manifestaciones del Dr. Urist sobre el componente fundamental de la matriz ósea desmineralizada (proteína ósea morfogenética): “*La BMP guía la modulación y diferenciación de las células mesenquimales del músculo en células óseas*”²¹⁶. En dicho artículo el Dr. Urist planteaba como hipótesis la posibilidad de que algunas especies animales contuvieran mayor cantidad de BMPs en su estructura que otras: “*La rata tiene comparativamente mayor cantidad de BMP que el conejillo de indias*”¹⁵⁸.

Reddi profundizó en la biología molecular y celular de la “osteogénesis ectópica” producida por matrices de hueso y dentina desmineralizada. Junto con Anderson, refinaron el trabajo de Urist sobre la osteogénesis inducida y proporcionaron la primera explicación creíble sobre el rol de las matrices óseas orgánicas, estableciendo las interrelaciones funcionales entre los extractos colagénicos solubles e insolubles. En referencia al trabajo de Lacroix, Reddi nominó a uno de estos factores como Osteogenina, que posteriormente se identificaría como BMP-3. Las investigaciones de Reddi, facilitarían posteriormente la clonación de BMPs recombinantes humanas¹⁰⁷.

Así, Wang y cols en 1.988 documentaron la purificación, secuenciación y clonación de las tres primeras BMP obtenidas a partir de extractos óseos¹⁶⁰. Posteriormente, en 1.990 s y colaboradores clonaron las BMP 7 y 8 (también denominadas proteínas osteogénicas 1 y 2 , [OP1 y OP-2]).

Las características, tipos y funciones de las diferentes BMP ya han sido previamente estudiadas en el apartado 4.3 de la presente Tesis Doctoral.

5.3 OBTENCIÓN DE MATRIZ ÓSEA DESMINERALIZADA

Los diferentes productos de DBM comercializados se obtienen de donantes humanos denominándose el hueso donante, aloinjerto. Por definición, el procesamiento del hueso donante para la obtención de DBM concluye con la obtención de un material libre de células viables, por lo que las DBM son en realidad aloimplantes. Como veremos posteriormente éste hecho tiene notables consideraciones legales. A pesar de ello, normalmente se definen con el término aloinjertos. Los aloinjertos, propiamente dichos, son analizados con mayor detalle en el Punto 6.2.

Aunque el proceso de manufactura de los productos de DBM disponibles comercialmente es variable, expondremos a continuación el procesamiento clásico para la obtención de ésta.

El proceso comienza con el debridamiento del hueso donante, generalmente huesos diafisarios largos, eliminando el tejido blando, incluyendo la médula ósea, la sangre y los lípidos. A continuación se aplica una solución antibiótica para iniciar el proceso de esterilización, después del cual el hueso es morselizado. Seguidamente se somete a la matriz resultante a un proceso de secado por congelación, obteniendo así un polvo desmineralizado que posteriormente puede ser formulado en forma de pasta, gel, o más reciente en tiras flexibles preformadas.

El proceso de secado ha planteado la utilización de un término alternativo al DBM: **DFDBA** (*Demineralized Freeze-Dried Bone Allograft*).

A continuación, la fase mineral del hueso es extraída mediante la inmersión en una solución ácida, que en la mayoría de los casos es de ácido clorhídrico a una concentración de 0,5 a 0,6N , en frío (4°C), durante 24 horas o más dependiendo de la cantidad a descalcificar, renovando diariamente la solución de HCl. Posteriormente los huesos son lavados y conservados por cualquiera de las múltiples técnicas existentes, Nilson et al¹⁶² , Urist et al¹⁵⁸ , preservando así la matriz orgánica.

La base biológica de la desmineralización de las DBM se explica , tal y como se comentó anteriormente, en que los preparados de DBM contienen Proteínas Óseas Morfogénéticas y teóricamente cantidades anormales de calcio podrían alterar su funcionamiento. No obstante, uno de los interrogantes que se ha planteado recientemente es que posiblemente, más que el contenido de BMP presentes en la DBM, es su extractibilidad y pauta de liberación en el organismo receptor, los factores más importantes a tener en cuenta.

Por otro lado, si los procedimientos de desmineralización son constantes, en ese caso tanto el tamaño de partícula del DBM tras la morselización, como la geometría de la fibra de DBM después del procesamiento, permiten definir el área de superficie de la DBM como una variable clínica. En este sentido, geometrías de superficie diferentes probablemente influyan no sólo en la interacción con las células del huésped sino también incidan en las tasas de difusión de las BMP desde la DBM. Así, se ha establecido que las partículas inferiores a 250 μm no son tan osteoinductivas como aquellas con un tamaño comprendido entre 420-840 μm ¹⁶⁰.

Por lo general, los datos preclínicos concernientes a la composición de DBM, su

formulación y el tamaño de partículas son cuanto menos inconsistentes o en la mayoría de los casos desconocidos.

Otro de los factores a considerar, teniendo en cuenta la edad de los sujetos donantes, es la posible inclusión de huesos impregnados de bisfosfonatos en los preparados de DBM. Recientes estudios han demostrado no obstante, que en pacientes con historia conocida de consumo de alendronato, el procedimiento de purificación del DBM elimina cualquier traza de este material en el DBM resultante.

Como señalábamos en el apartado 1 de la Introducción, La composición del hueso cortical es aproximadamente de un 70% de material inorgánico (sales cálcicas fundamentalmente) y un 30% de materia orgánica; una vez extraídas las sustancias solubles en agua y en cloroformometanol, el peso en seco de la matriz libre está compuesto en un 80% de colágeno óseo, 10% de proteínas no colágenas y un 2% de sustancias no determinadas.

La DBM contiene colágeno de tipo 1, proteínas no colágenas y factores de crecimiento osteoinductivos, tales como: BMP, los GDF (factores de diferenciación de crecimiento) y, posiblemente, los TGF- β 1, 2 y 3. La presencia de estos factores en mayor o menor concentración, determinan la capacidad osteogénica observada en los modelos experimentales, de los diferentes compuestos derivados de la DBM disponibles en la actualidad.

Evidentemente, el hueso descalcificado pierde todas sus propiedades de dureza y de resistencia a la compresión, tal y como se demuestra en el estudio de Itoman y Nakamura¹⁶³, por lo que no puede emplearse para rellenar pérdidas de sustancia en huesos que deban soportar esfuerzos mecánicos sin un andamiaje suplementario que permita absorber estas fuerzas.

Con el fin de contrarrestar estos efectos, diversos autores han realizado

modificaciones del procedimiento original para la obtención de la matriz ósea desmineralizada, con descalcificaciones parciales, variando así la cantidad de mineral en la DBM resultante, manteniendo no obstante su capacidad osteoinductiva¹⁶⁴. En la actualidad la práctica totalidad de DBM disponibles comercialmente están basadas en fórmulas completamente desmineralizadas.

Garantizar la seguridad del receptor impidiendo la transmisión viral o priónica, manteniendo al mismo tiempo la capacidad osteoinductiva del injerto es otro de los puntos clave en el desarrollo de las DBM comercialmente disponibles. En este sentido se ha comprobado que los diferentes métodos de esterilización empleados en la preparación de los implantes de DBM pueden tener efectos de mayor o menor importancia sobre dicha capacidad osteoinductiva¹⁶⁵. Munting y cols¹⁶⁶ estudiaron diferentes preparados de DBM previamente sometida a esterilización con varios agentes químicos y físicos, llegando a las siguientes conclusiones.

a. El glutaraldehído en líquido, el formaldehído en gas y el óxido de etileno, eliminan gran parte de la capacidad osteoinductiva del implante. No obstante, experimentos posteriores demostraron que la esterilización del injerto con óxido de etileno, especialmente cuando está liofilizado, no tiene influencia sobre la osteoinducción¹⁶⁷.

b. El merthiolate no reduce la capacidad osteoinductiva del injerto, pero no es esporicida.

c. Otro método de esterilización, la irradiación gamma con Co⁶⁰ produce una disminución de la osteoinductividad por debajo de 25 cGy. Por encima de esta dosis la osteoactividad quedaría totalmente abolida y el implante sería absorbido sin producir hueso nuevo. No obstante, si la irradiación se produce a bajas temperaturas (-72°C) los efectos sobre la osteoinducción parecen minimizarse, de lo que se desprende que la

temperatura durante la irradiación juega un papel crítico en la protección contra el daño por irradiación²¹⁶⁸.

El producto final del proceso de desmineralización es la DBM en polvo, difícil de manejar a nivel clínico. Con el fin de mejorar el manejo del injerto e incrementar sus propiedades adsorptivas, así como facilitar su almacenamiento y distribución comercial se han desarrollado diferentes transportadores o “carriers”, tales como el hialuronato sódico, glicerol o la gelatina porcina, ninguno de los cuales ha demostrado ser netamente superior al resto. Ello ha determinado la aparición de numerosas formulaciones de DBM: polvo, gel, pasta, bloque, etc. Cada una de ellas presenta unas teóricas ventajas en cuanto al manejo clínico y rango de aplicación^{146,147}.

En la actualidad, la formulación más extendida es la pasta moldeable (*putty*) que permite su empaquetación en los defectos óseos y resiste la dispersión producida por la sangre y/o la irrigación durante la cirugía. La conversión del polvo de DBM a una pasta moldeable precisa de la formulación del polvo de DBM con un *carrier* viscoso que permita la suspensión estable de las partículas de DBM.

Los *carrier* viscosos pueden clasificarse en: polímeros hidrosolubles tales como el hialuronato sódico o la carboximetilcelulosa o solventes hidrófugos como el glicerol. Además, DBM puede mezclarse con otro tipo de carriers en forma de hojas flexibles que pueden incluso llegar a contener chips de hueso o en combinación con Pluronic®**DDD**. Éste es un carrier de copolímero biomédico termosensitivo que tiene la particularidad de volverse más rígido con la temperatura corporal.

En una línea similar podemos encontrar un carrier hidrosoluble termoplástico a partir de colágeno porcino. Estas dos últimas variantes fundamentalmente facilitan el manejo clínico de la DBM. Los estudios en los que se analizan la efectividad de los diferentes

carriers son muy limitados y no existen datos concluyentes al respecto.

Por otro lado, para evaluar la capacidad osteoinductiva *in vitro* de la DBM Han et al¹⁶⁵ proponen un sistema basado en sus experiencias con cultivos celulares. Los autores introducen polvo de DBM en un cultivo celular en el que se encuentran células de osteosarcoma murino a diferentes concentraciones y fibroblastos periósticos, produciéndose un aumento significativo de la proliferación celular en comparación con los controles. El efecto pico fue en el segundo día para las células de osteosarcoma murino, y el cuarto día para los fibroblastos. Estos aumentos en la proliferación celular pueden ser cuantificados y servir como referencia para otros preparados de DBM. No obstante como veremos posteriormente su extrapolación a la práctica clínica es limitada.

5.4 UTILIZACIÓN CLÍNICA DE LA MATRIZ ÓSEA DESMINERALIZADA

Como la verdadera prueba de osteoinductividad es si un material que ha sido implantado en una localización extraósea genera hueso, la incapacidad del aloinjerto o xenoinjerto óseo para efectuar esto en los pacientes indica que no tiene actividad osteoinductiva sustancial. La matriz ósea desmineralizada ha mostrado provocar este efecto en estudios en animales, pero no se ha demostrado el mismo efecto en pacientes. Además, se ha observado que diferentes productos de matriz ósea desmineralizada varían en su respuesta osteogénica en modelos animales. En este sentido, uno de los principales objetivos del presente proyecto de Tesis Doctoral es el de comparar la eficacia osteoinductiva de dos DBM comercialmente disponibles y ampliamente utilizados en el ámbito de la Cirugía Maxilofacial (DBX® y Colloss®), con un modelo experimental estandarizado.

En los últimos 10-15 años se ha utilizado el modelo experimental de fusión espinal en rata atímica para comparar la eficacia osteoinductiva de diferentes formulaciones de DBM^{169,170}. Los resultados, utilizando el mismo modelo animal son cuanto menos poco

consistentes y en ocasiones , tal y como detalla Bae¹⁷⁰ , demuestran la variabilidad en la eficacia de diferentes lotes del mismo producto, lo que a su vez parece reflejar la variabilidad en la producción de cada lote.

La concentración de proteínas osteoinductivas en la matriz ósea del donante, su capacidad osteoinductiva intrínseca así como las diferencias genéticas en la expresión de proteínas morfogenéticas parece que puedan jugar un papel importante en la variabilidad de resultados anteriormente mencionada¹⁷¹⁻¹⁷⁴. En este sentido, en 2.007, Wioldemann y cols¹⁷⁵ publicaron un estudio en el que se analizaba la concentración de factores de crecimiento en 10 lotes de producto entre tres DBM comercialmente disponibles para su uso en humanos: DBX putty®, Grafton DBM putty®, y AlloMatrix putty®. Los tres productos son obtenidos a partir de donantes humanos y sólo difieren en los *carrier* añadidos (Tabla 4). Evidenciaron diferencias entre los tres DBM y entre lotes del mismo producto, tanto en la cantidad total de proteínas como en los valores absolutos de factores de crecimiento presentes en el producto. No obstante en los tres , BMP-2 era el factor de crecimiento más abundante con una cantidad aproximada de 3,6 microgramos por gramo de tejido. Concluían que dadas las diferencias entre muestras individuales eran necesarios estudios complementarios para optimizar la utilización clínica de la DBM.

Precisamente la consistencia en la eficacia osteoinductiva de DBX® y Colloss® es uno de los aspectos que con el presente proyecto de Tesis Doctoral trataremos de analizar.

La DBM para uso clínico en humanos fue comercializada por primera vez en 1.991 por Osteotech (*Medtronic, Easttown, New Jersey, EE.UU.*) , con el nombre de Grafton®. Inicialmente se desarrolló como alternativa a la criopreservación de aloinjertos óseos con el fin de disminuir los costes de mantenimiento de los bancos de hueso

Con el fin de mejorar el manejo de la DBM y al mismo tiempo facilitar que ésta permaneciese en la zona aplicada se comercializó asociada a un transportador o carrier de glicerol. Progresivamente en los últimos años se han comercializado diversos compuestos basados en la DBM, en los que se ha modificado el *carrier* (gelatina porcina, ácido hialurónico, etc.), el porcentaje de DBM así como el origen del hueso donante (alogénico, xenogénico) (Tabla 4)

TABLA 4. MATRICES ÓSEAS DESMINERALIZADAS DISPONIBLES COMERCIALMENTE (*Adaptado de Gruskin et al¹⁴⁶*)

COMPAÑÍA	NOMBRE COMERCIAL	COMPOSICIÓN	FORMAS DISPONIBLES MERCADO	MECANISMOS TEÓRICOS DE ACTUACIÓN	EVIDENCIA CIENTÍFICA
<i>AlloSource</i>	<i>AlloFuse™</i>	Copolímero termosensible + DBM	Gel inyectable y puty	Osteoconducción Bio-reabsorbible Osteoinducción	Casos Clínicos Estudios en animales Cultivos celulares
<i>Biomet</i>	<i>InterGro®</i>	DBM con carrier de lecitina	Pasta, putty y mezcla con granulós compuestos de HA.	Osteoconducción Bio-reabsorbible Osteoinducción	Casos Clínicos Estudios en animales Cada lote testado para valorar osteoinducción.
<i>Exactech</i>	<i>Optecure®</i>	DBM suspendido en un carrier de hidrogel	Kit con polvo en seco acompañado de solución salina tamponada.	Osteoconducción Bio-reabsorbible Osteoinducción Osteogénesis cuando se combinan con chips de hueso	Estudios en humanos Casos Clínicos Estudios en animales Cada lote testado para valorar osteoinducción.
	<i>Optecure®+CC</i>	DBM y CCC suspendidos en un carrier de hidrogel.	Kit con polvo en seco acompañado de solución salina tamponada.	Osteoconducción Bio-reabsorbible Osteoinducción Osteogénesis cuando se combinan con chips de hueso	Estudios en humanos Casos Clínicos Estudios en animales Cada lote testado para valorar osteoinducción
	<i>Optefil®</i>	DBM suspendido en carrier de gelatina	Kit con polvo en seco acompañado de solución salina tamponada + hueso inyectable.	Osteoconducción Bio-reabsorbible Osteoinducción Osteogénesis cuando se combinan con chips de hueso	Estudios en humanos Casos Clínicos Estudios en animales Cada lote testado para valorar osteoinducción
	<i>Opteform®</i>	DBM y chips de cortical cancellous chips suspendidos en carrier de gelatina.	Pasta modelable o polvo seco listo para ser rehidratada	Osteoconducción Bio-reabsorbible Osteoinducción Osteogénesis cuando se combinan con chips de hueso	Estudios en humanos Casos Clínicos Estudios en animales Cada lote testado para valorar osteoinducción
<i>Integra Orthobiologics/ (IsoTis OrthoBiologic)</i>	<i>Accell Connexus®</i>	DBM, Accell Bone Matrix, Reverse Phase Medium	Pasta inyectable	Osteoconducción Bio-reabsorbible Osteoinducción	Estudios en humanos Casos Clínicos Estudios en animales Cada lote testado para valorar osteoinducción

<i>Integra Orthobiologics/ (IsoTis OrthoBiologic)</i>	<i>Accell Evo3™</i>	DBM, Accell Bone Matrix, Reverse Phase Medium	Pasta inyectable	Osteoconducción Bio-reabsorbible Osteoinducción	Estudios en humanos Casos Clínicos Estudios en animales Cada lote testado para valorar osteoinducción
	<i>Accell TBM®</i>	DBM, Accell Bone Matrix	Tiras de diversos tamaño	Osteoconducción Bio-reabsorbible Osteoinducción	Estudios en humanos Casos Clínicos Estudios en animales Cada lote testado para valorar osteoinducción
	<i>DynaGraft II DBM,</i>	Reverse Phase Medium	Pasta inyectable	Osteoconducción Bio-reabsorbible Osteoinducción	Estudios en humanos Casos Clínicos Estudios en animales Cada lote testado para valorar osteoinducción
	<i>OrthoBlast II</i>	DBM, hueso esponjoso, Reverse Phase Medium	Pasta inyectable	Osteoconducción Bio-reabsorbible Osteoinducción	Estudios en humanos Casos Clínicos Estudios en animales Cada lote testado para valorar osteoinducción
<i>LifeNet Health</i>	<i>IC Graft Chamber®</i>	DBM + Partículas de hueso	Liofilizado y empaquetado en tamaños diferentes con una cámara de dispensación	Osteoconducción Bio-reabsorbible Osteoinducción Diseñado para ser usado con sangre, PRP o médula ósea para potenciar la actividad de la DBM	Estudios animales Casos Clínicos
	<i>Optium DBM®</i>	DBM combinada con carrier de glicerol	Pasta moleable (fibras óseas) y gel inyectable (partículas óseas)	Osteoconducción Bio-reabsorbible Osteoinducción	Estudios en humanos Estudios animales Casos Clínicos
<i>Medtronic Spinal & Biologics</i>	<i>Osteofil® DBM</i>	DBM + gelatina porcina	Pasta inyectable y tiras moldeables	Osteoconducción Bio-reabsorbible Osteoinducción	Estudios en humanos Estudios animales Casos Clínicos
	<i>Progenix™ Plus</i>	DBM + alginato y colágeno bovino de tipo I	Putty con chips de cortical desmineralizados	Osteoconducción Bio-reabsorbible Osteoinducción	Estudios animales Casos Clínicos
	<i>Progenix™ Putty</i>	DBM + alginato y colágeno bovino de tipo I	Putty inyectable	Osteoconducción Bio-reabsorbible Osteoinducción	Estudios animales Casos Clínicos
<i>MTF/Orthofix</i>	<i>Trinity Evolution™</i>	Matriz ósea celular viable	Múltiples volúmenes disponibles	Osteogénesis Osteoinducción Osteoconducción	Estudios animales Casos Clínicos
<i>MTF/Synthes</i>	<i>DBX®</i>	DBM + carrier de hialuronato sódico	Pasta, putty y tiras	Osteoconducción Bio-reabsorbible Osteoinducción	Estudios en humanos Estudios animales Casos Clínicos
<i>Osteotech</i>	<i>GRAFTON® A-Flex®</i>	Tecnología de DBM fibrilar	Hoja redondeada flexible	Osteogénesis cuando se mezcla con aspirado de médula ósea o injerto de hueso autólogo Osteoinducción Osteoconducción	Estudios humanos publicados (incluyendo estudios prospectivos de niveles I y II) Casos Clínicos

				Incorporación/Re modelación completa	Estudios Animales Cada lote testado in vivo para osteoinducción
	GRAFTON® Crunch®	Fibras de DBM con cubos de hueso cortical desmineralizado	Injerto empaquetado	Osteogénesis cuando se mezcla con aspirado de médula ósea o injerto de hueso autólogo Osteoinducción Osteoconducción Incorporación/Re modelación completa	Estudios humanos publicados (incluyendo estudios prospectivos de niveles I y II) Case Reports Estudios Animales Cada lote testado in vivo para osteoinducción
	GRAFTON® Gel DBM in a syringe MIS and Percutaneous Injectable graft	DBM en jeringa	Injerto MIS y percutáneo	Osteogénesis cuando se mezcla con aspirado de médula ósea o injerto de hueso autólogo Osteoinducción Osteoconducción Incorporación/Re modelación completa	Estudios humanos publicados (incluyendo estudios prospectivos de niveles I y II) Case Reports Estudios Animales Cada lote testado in vivo para osteoinducción
	GRAFTON® Matrix Scoliosis Strips	Tiras + Tecnología de fibra de DBM	Tiras de varios tamaños	Osteogénesis cuando se mezcla con aspirado de médula ósea o injerto de hueso autólogo Osteoinducción Osteoconducción Incorporación/Re modelación completa	Estudios humanos publicados (incluyendo estudios prospectivos de niveles I y II) Casos Clínicos Estudios Animales Cada lote testado in vivo para osteoinducción
	GRAFTON® Orthoblend Large Defect	Fibras de DBM con chips de esponjosa machacados	Injerto empaquetable	Osteogénesis cuando se mezcla con aspirado de médula ósea o injerto de hueso autólogo Osteoinducción Osteoconducción Incorporación/Re modelación completa	Estudios humanos publicados (incluyendo estudios prospectivos de niveles I y II) Casos Clínicos Estudios Animales Cada lote testado in vivo para osteoinducción
	GRAFTON® Orthoblend Small Defect	Fibras de DBM con chips de esponjosa de mayor tamaño	Injerto empaquetable y modelable	Osteogénesis cuando se mezcla con aspirado de médula ósea o injerto de hueso autólogo Osteoinducción Osteoconducción Incorporación/Re modelación completa	Estudios humanos publicados (incluyendo estudios prospectivos de niveles I y II) Casos Clínicos Estudios Animales Cada lote testado in vivo para osteoinducción
<i>Regeneration Technologies</i>	BioSet™	DBM combinado con carrier natural de gelatina	Pasta o Putty inyectable, tiras o bloques con chips de esponjosa	Osteoconducción Bio-reabsorbible Osteoinducción	Estudios en humanos Casos Clínicos Estudios Animales Cada lote testado in vivo para osteoinducción
<i>Smith & Nephew DBM</i>	VIAGRAF	DBM + glicerol	Putty, pasta, gel.	Osteoconducción Bio-reabsorbible Osteoinducción	Estudios en animales

<i>Wright Medical Technology</i>	ALLOMATRIX®	DBM con/sin CBM + Sulfato cálcico.	Volúmenes variables de putty/pasta inyectable	Osteoconducción Bio-reabsorbible Osteoinducción	Estudios en humanos Casos Clínicos Estudios Animales
	ALLOMATRIX® RCS	DBM + Tecnología calciplex™ + sulfato cálcico	Volúmenes variables de putty inyectable	Osteoconducción Bio-reabsorbible Osteoinducción	Estudios en animales
	IGNITE®	DBM + polvo de sulfato cálcico para ser mezclado con aspirado de médula ósea	Injerto percutáneo para fracturas problemáticas	Osteoconducción Bio-reabsorbible Osteoinducción	Estudios en humanos Casos Clínicos Estudios Animales
	PRO-STIM™	Injerto inductivo inyectable 50% sulfato cálcico, 10% fosfato cálcico y 40% DBM	Volúmenes variables de pasta/putty inyectable	Osteoconducción Bio-reabsorbible Osteoinducción	Casos Clínicos Estudios Animales
<i>Zimmer</i>	Puros® DBM	Aloinjerto DBM + chips	Volúmenes variables de pasta/putty inyectable	Osteoconducción Bio-reabsorbible Osteoinducción	Cada lote testado para osteoinducción en rata

Como señalábamos al inicio del capítulo si analizamos en conjunto los estudios realizados con las DBM comercialmente disponibles, comprobamos que si bien en estudios en animales se han demostrado los efectos osteoinductivos de la matriz ósea desmineralizada, no existen ensayos clínicos en humanos que desprendan resultados similares. Informes de casos aislados y revisiones retrospectivas no controladas han indicado posibles efectos terapéuticos de la matriz ósea desmineralizada en el tratamiento de quistes falángicos¹⁷⁶, fracturas¹⁷⁷ y cirugía preprotésica maxilofacial¹⁷⁸⁻¹⁸², no obstante por el momento no disponemos de ningún estudio de nivel I sobre la utilización de matriz ósea desmineralizada aislada en seres humanos.

Finalmente, existen dudas todavía respecto a la comercialización de este tipo de compuestos. Como estos materiales se desarrollaron originalmente como tejidos humanos reprocessados, la autorización para la comercialización se logró sin necesidad de realizar estudios controlados aleatorizados que comparasen su eficacia con la del hueso autólogo. Sin embargo, como las formulaciones de estos productos comercializadas en la actualidad incluyen vehículos como glicerol, almidón y ácido

hialurónico, la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) planifica ahora reglamentar los productos de matriz ósea desmineralizada como dispositivos médicos de clase II. Lo más probable es que los productos de matriz ósea desmineralizada comercializados en la actualidad sean reclasificados para demostrar una equivalencia sustancial respecto de un dispositivo precedente (legalmente comercializado), a pesar de que todavía no se requiera demostrar su eficacia en comparación con la del injerto óseo autólogo.

5.5 DBX®

Según refiere la compañía distribuidora, DBX® (*Synthes, Paoli, California, EE.UU.*) es una formulación de matriz ósea desmineralizada obtenida a partir de donantes humanos con un carrier biocompatible cuya elaboración tiene lugar en la *Musculoskeletal Transplant Foundation (MTF), New Jersey, EE.UU.*). La MTF es una organización sin ánimo de lucro que en la actualidad se considera el banco de hueso más importante en Estados Unidos. Según el protocolo de dicha organización los potenciales donantes son seleccionados en base a ciertos requerimientos establecidos, de los que únicamente detallan el criterio de selección en base al género y la edad siendo: de 12 a 70 años para mujeres y hombres. Según refieren, todos los tejidos y muestras sanguíneas son testados para una amplia variedad de enfermedades infecciosas incluyendo testado para ácido nucleico de VIH y VHC. Igualmente incluyen una batería estándar para: VIH-1, VIH-2, HTLV-I, HTLV-II, HBc, RPR, HCV-Ab, HbsAg, HIV-1 NAT, HCV NAT. Todos los tejidos donantes son recuperados, de acuerdo a los protocolos de la AATB (*American Association of Tissue Banks*) mediante técnicas asépticas. Esto determina que al utilizar también técnicas asépticas durante su procesado, teóricamente se elimina la necesidad de realizar un proceso de esterilización terminal. En este sentido en la manufactura de DBX®, se afirma que en su proceso de esterilización no se emplea irradiación¹⁸³ ni calor, para mantener las propiedades osteoinductivas.

El carrier utilizado es Hialuronato Sódico con tampón fosfato dibásico de alta calidad, producido mediante procesos de fermentación GMP, con certificado ISO 13485. Afirman que el carrier de hialuronato cumple los estándares de seguridad y al mismo tiempo facilita el manejo del compuesto^{184,185}.

El método de producción, tal y como refleja su dossier, consiste en la retirada del componente mineral del hueso cortical (sin especificar el tipo de hueso donante). Afirman que contiene colágeno y proteínas óseas morfogénicas y que su formulación ha sido diseñada para imitar la presión osmótica de la sangre humana así como el pH fisiológico con el fin de obtener un crecimiento óseo óptimo.

Según refleja la compañía la cantidad media de BMP-2 en DBX es de alrededor de 3,8 microgramos/gramo de DBX®, y destaca la presencia de valores elevados de FGFa y TGF- β 1, en comparación con otros preparados de DBM comercialmente disponibles. Estos datos son congruentes con aquéllos publicados por Wieldeman y cols¹⁷⁵ en 2.007.

Afirman que DBX® es completamente sustituido por el hueso receptor en un plazo de 4 a 6 meses.

Las formulaciones de DBX incluyen:

- DBX Putty® (93% de Ácido Hialurónico)
- DBX Mix® (Mezclado con chips de hueso cortical)
- DBX Strip® (Mezcla de ácido hialurónico y gelatina porcina)

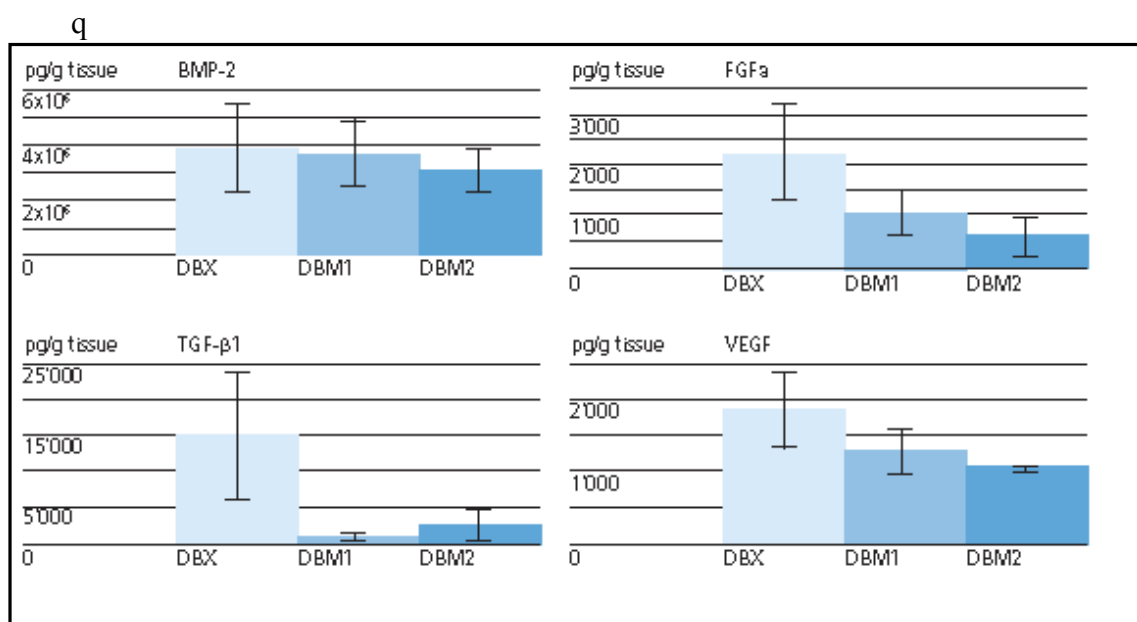


FIGURA 25. Contenido de factores de crecimiento en DBX®. Prof. Dr. Med. G. Schmidmeier, Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie, Berlin, 2004



-

FIGURA 26. Imagen del Dossier Informativo de DBX putty

En el presente proyecto de Tesis Doctoral se ha utilizado la formulación DBX- Putty® en viales de 1 ml.

5.6 COLLOSS E®

De acuerdo con el dossier informativo de la compañía productora (*Ossacur AG, Oberstenbeld, Alemania*), Colloss® es un liofilizado de hueso bovino en cuyo procesamiento no se desnaturalizan las proteínas, por lo que se supone que se mantienen intactas las propiedades biológicas del colágeno y otras proteínas óseas. En los procedimientos estándar de producción de colágeno o gelatina las proteínas se desnaturalizan y, por lo tanto, la capacidad osteoinductiva (dependiente de proteínas no colágenas) se pierde. Probablemente hay otras proteínas nativas y factores de crecimiento del hueso que se mantienen en su estructura y que podrían ayudar en el proceso reparativo.

No se ha podido encontrar documento o ensayo experimental alguno en el que se determine la exacta cantidad de factores de crecimiento óseos presentes en el colágeno liofilizado. No obstante según afirma la compañía manufacturadora se considera que el material contiene cantidades significativas de BMPs y TGF- β 1.

La presentación comercial del colágeno liofilizado es como un material de textura algodonosa sin resistencia alguna a la presión. Por ello, se recomienda no empaquetar el material dentro de los defectos, ya que el volumen final se vería notablemente reducido, con lo que su capacidad regeneradora se vería limitada a un área de menor extensión.

Por otro lado algunos autores proclaman la conveniencia de mantener la estructura porosa para favorecer su papel como vehículo de distintos materiales¹⁸⁶. Por estos motivos, cuando por la forma y límites de la cavidad tiende a comprimirse el biomaterial, se recomienda ajustar una malla de titanio que impida el colapso. El colágeno liofilizado produce una cantidad de hueso regenerado comparable al hueso autólogo en estudios experimentales en animales con defectos críticos de hueso¹⁸⁷.

Debido a su estructura algodonosa, se emplea principalmente en el tratamiento de defectos de hueso estables. La presencia de niveles ácidos de pH en el lecho receptor, característico de los tejidos infectados, inactiva este biomaterial¹⁸⁸.



FIGURA 27. Imagen del Dossier Comercial de Collos®

6. SUSTITUTOS DE INJERTO ÓSEO OSTEOCONDUCTIVOS

6.1 OSTEOCONDUCCIÓN

La osteoconducción es el proceso por el cual un armazón poroso, gracias a su estructura tridimensional, facilita el crecimiento óseo en su interior¹⁸⁹. Los materiales preferentemente osteoconductores son los colágenos, cerámicas, biocristales, polímeros, xenoinjertos, e hidroxiapatitas sintéticas¹⁸⁹.

Al insertar el material osteoconductor adyacente al tejido óseo, los capilares, tejido perivascular y células osteoprogenitoras migran en los espacios porosos e incorporan la estructura porosa en el nuevo hueso. El primer fenómeno es la vascularización, y eventualmente se produce posteriormente neoformación ósea. El sustrato osteoconductor no es viable, sino sólo un armazón cuya presencia lleva a un crecimiento activo del hueso y el tejido fibrovascular. En el injerto autólogo se produce primero la

invasión fibrovascular, luego la formación ósea directa en los intersticios de las trabéculas y luego la eliminación del hueso necrótico y la remodelación ósea.

La importancia de la osteoconducción y la dependencia de la estructura tridimensional del injerto en el curso de este proceso se demuestran por el diferente comportamiento de los injertos de hueso cortical y de hueso trabecular en cuanto a su velocidad y porcentaje de integración en el lecho receptor. De ahí se deduce que la osteoconducción requiere, como condición “sine qua non”, que el material sea poroso. La importancia del ambiente químico en el éxito del injerto es comprendida en menor medida^{189,190}.

La mera porosidad no es suficiente para promover el crecimiento óseo en el interior del biomaterial; también debe existir interconectividad. Es decir, no basta con que el material tenga “agujeros”, sino que éstos deben estar conectados entre sí. Hay un cierto consenso en que el tamaño ideal de poro es de entre 100 y 500 μm , y las interconexiones deben ser al menos de 100 μm ¹⁹¹.

6.2 ALOINJERTO

Alrededor de un tercio de los injertos óseos practicados en Norteamérica corresponde a aloinjertos¹⁹⁰. Representan una alternativa interesante al hueso autógeno, pues evitan la morbilidad del sitio donante, son relativamente abundantes y se pueden almacenar en depósitos o bancos de hueso.

Las posibles aplicaciones en el contexto de la cirugía esquelética reconstructiva comprenden la reconstrucción de defectos esqueléticos, la potenciación del proceso de reparación de fracturas y el tratamiento de la pseudoartrosis¹⁹².

La transmisión de enfermedades constituye el riesgo y la desventaja principales de los materiales de aloinjerto, aumentando cuando se emplean aloinjertos frescos, por lo que éstos últimos se utilizan con mucha menor frecuencia. No obstante hay que tener en cuenta que, aunque hay riesgo de transmisión de infecciones bacterianas y virales, se

han comunicado relativamente pocos casos, si se tiene en cuenta el gran número de procedimientos practicados cada año¹⁹³.

Los aloinjertos congelados se conservan a temperaturas inferiores a -60°C , lo que disminuye la degradación enzimática y la respuesta inmunológica del huésped. La desecación por congelamiento implica la extracción de agua del tejido, envasado al vacío y almacenamiento a temperatura ambiente. Esta técnica de procesamiento destruye todas las células osteogénicas dejando una capacidad osteoinductiva limitada. Por otro lado, precisamente por ello la respuesta inmunológica del huésped es menos enérgica con estas formulaciones liofilizadas que frente al aloinjerto fresco o fresco congelado. Los aloinjertos pueden procesarse como polvo, fragmentos esponjosos o corticales, cuñas, cilindros o puntales. Además, se les puede dar diferentes forma mediante fresado de las piezas, para determinadas situaciones en las que se precisa una forma concreta, como por ejemplo en forma de tornillo¹⁹⁴.

La esterilidad es una preocupación importante cuando se emplean aloinjertos. Por ello, es fundamental la recuperación aséptica de tejidos y la investigación sistemática adecuada del donante. Aún así se se deben practicar pruebas serológicas a los tejidos obtenidos, entre los que se debe incluir la detección de anticuerpos contra VIH-1 (virus de la inmunodeficiencia humana-1), VIH-2 y VHC (virus de la hepatitis C), anti HBC, HTLV-I (Virus de la Leucemia humana de células T), CMV y sífilis.

Los injertos se pueden procesar o someter a esterilización terminal. Se efectúa con técnicas ya comentadas anteriormente al hablar de la matriz ósea desmineralizada como irradiación gamma o esterilización con óxido de etileno. La esterilización con óxido de etileno es más rentable, pero puede afectar negativamente la resistencia mecánica o la actividad biológica del injerto.

La esterilización terminal con radiación gamma ha mostrado ejercer mayores efectos sobre las propiedades osteoinductivas de los aloinjertos¹⁹⁴.

El riesgo de transmisión de enfermedades por aloinjertos frescos, y la dificultad de almacenamiento y distribución de estos injertos han determinado que predomine la utilización de aloinjertos frescos-congelados y congelados-desechados¹⁹³.

Los aloinjertos son fundamentalmente osteoconductivos, pero conservan una cantidad variable de proteínas osteoinductivas. Ello va a determinar una variabilidad en las propiedades osteoinductivas según el tipo de aloinjerto y los métodos de procesamiento empleados para preparar, esterilizar y almacenar el material de aloinjerto antes del implante.

La incorporación del aloinjerto óseo se basa fundamentalmente en la osteoconducción pasiva y difiere según el tipo de injerto empleado. Los injertos óseos corticales son incorporados básicamente mediante sustitución por arrastre (*creeping substitution*) a través del proceso de osteogénesis intramembranosa en las uniones corticales¹⁹⁵. Este proceso implica el debilitamiento de la fuerza estructural inicial del injerto cortical a medida que éste es reabsorbido. La fuerza se recupera a medida que se produce nueva osteogénesis¹⁹⁶.

6.3 SUSTITUTOS ÓSEOS SINTÉTICOS

Se calcula que en Estados Unidos, el 10% aproximadamente de los injertos óseos empleados corresponden a sustitutos óseos sintéticos, y esta cifra está aumentando de manera significativa en los últimos años¹⁹⁷. Estos sustitutos óseos sintéticos pueden estar compuestos por hidroxiapatita, fosfato tricálcico, sulfato cálcico o una combinación de estos minerales¹⁹⁸.

En la actualidad se están publicando numerosísimos estudios sobre el empleo clínico

de diversos compuestos de este tipo y aunque las indicaciones no están aún claramente establecidas, en muchas situaciones parecen superponerse a las de los auto y aloinjertos¹⁹⁹.

En general, salvo que se realicen modificaciones sobre los mismos, este tipo de compuestos estimulan la regeneración ósea al suministrar una matriz osteoconductiva para que las células osteogénicas del huésped sintetizen hueso bajo la influencia de los factores osteoinductivos del huésped¹⁹⁵.

Sin entrar a analizar las diferencias entre los diversos compuestos disponibles en el mercado, los sustitutos óseos sintéticos comparten diversas ventajas sobre los auto y los aloinjertos, incluyendo la ilimitada disponibilidad, la facilidad para su esterilización y su almacenaje²⁰⁰. Sin embargo presentan diversas limitaciones, como la variabilidad en su carácter osteoconductor, las diferencias entre la repoblación celular de las diferentes matrices, los efectos potencialmente adversos sobre el remodelado óseo normal y los aspectos comerciales relacionados con su utilización. Además, una característica común de estos productos es su escasa capacidad para proporcionar soporte mecánico porque son frágiles y tienen escasa resistencia a la tracción contraindicando así su uso como injertos estructurales²⁰¹.

6.4 XENONJERTO: BIO-OSS®

Bio-Oss® (*Geistlich Biomaterials, Wolfhusen, Suiza*) es un xenoinjerto obtenido del hueso bovino, presentado comercialmente en forma de bloques y gránulos de esponjosa, láminas de cortical y bloques de esponjosa con colágeno añadido. Se elabora mediante un procedimiento patentado, que incluye la limpieza, desgrasado con detergentes, y extracción química de las proteínas a baja temperatura²⁰⁰. Durante el proceso de fabricación la totalidad de la matriz orgánica es eliminada sin alterar la estructura de microtúneles existentes entre los cristales de apatita. De esta forma se obtiene una matriz

mineral remanente con cristales de hidroxiapatita de aproximadamente 150 micras que presenta propiedades químicas, morfológicas y ultraestructurales muy parecidas a las del hueso humano (Figura 28).

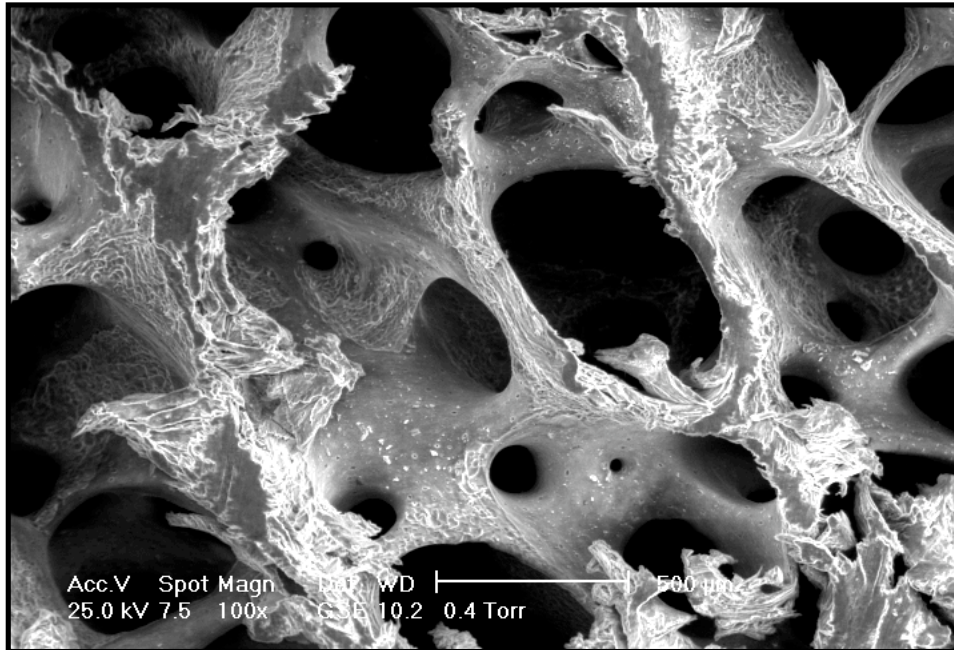


FIGURA 28. Imagen en detalle de la porosidad del Bio-Oss obtenida con Microscopía Electrónica de Barrido. (Geistlich Biomaterials, Wolfhusen, Suiza) .

Las propiedades físicas del material son también similares a las del hueso: la resistencia a la compresión es de 35 Mpa⁴ ; el módulo de elasticidad del Bio-Oss® es de 11 Gpa y el del hueso humano, de 1,4 Gpa. Se trata de un material con estructura trabecular, con un tamaño de poro entre 300 y 1500 μm. Los poros suponen el 70-75% de su volumen, por lo que presenta una elevada área superficial por unidad de masa (79,7 m²/g)²⁵².

La osteointegración en superficies mecanizadas es menor que sobre superficies rugosas. En este sentido, Bio-Oss® presenta una topografía rugosa que favorece el anclaje osteoblástico así como la proliferación y síntesis de matriz ósea sobre su superficie^{201,202}.

⁴ **Mpa:** Megapascals. **Gpa:** Gigapascals

Otro factor fundamental en la capacidad osteoconductiva de un determinado material es el área de superficie interna que mide el espacio disponible existente en un material para el crecimiento del tejido óseo en formación. En este sentido y tal y como señalábamos anteriormente, la particular estructura tridimensional cristalina del Bio-Oss® le confiere una elevada área superficial por unidad de masa en comparación con otros biomateriales²⁰³.

Una vez depositado el Bio-Oss® se produce la adsorción de sangre y proteínas séricas (destacando el anclaje medidado por integrinas) entre los microporos del mismo. Progresivamente se produce la migración de células sanguíneas y osteoblastos procedentes de los márgenes del defecto. Con el tiempo se desarrolla una extensa red de microcapilares y se comienza a depositar la matriz osteoide. Gracias a su estructura tridimensional y su superficie rugosa, este fenómeno se produce en elevada cuantía, lo que quizás sea responsable de su excelente capacidad osteoconductiva.

En este sentido ciertos estudios experimentales, como el de Schlegel²⁰² en los que este biomaterial se compara con el hueso autólogo, concluyen que tanto el hueso autólogo como el Bio-Oss® provocan la aparición de cantidades similares de hueso neoformado.

Teóricamente, las características de este material permitirían su progresiva reabsorción por los osteoclastos, permitiendo de esta forma un remodelado completo del xenoinjerto, incrementado así las características biomecánicas del mismo, una vez implantado. No obstante, los resultados experimentales a este respecto son cuanto menos confusos o contradictorios. Si bien en algunos estudios se ha demostrado una progresiva desaparición del biomaterial del lecho de implantación, así como la presencia de osteoclastos activos en su superficie^{203,204} otros autores, sin embargo, no encuentran tales hallazgos, o en todo caso tanto la desaparición del material como la presencia de osteoclastos activos son fenómenos cuantitativamente modestos^{205,206}.

En el ser humano este material se utiliza principalmente en intervenciones de aumento óseo del área maxilofacial, tales como las técnicas de cirugía periodontal, así como en procedimientos de elevación de seno maxilar para la colocación de implantes osteointegrados²⁰⁷. En la práctica clínica el Bio-Oss® se administra bien aisladamente o bien mezclado con injertos óseos autólogos u otros materiales. Dada su lenta tasa de reabsorción, la matriz de Bio-Oss® sirve como componente estable para el hueso neoformado y previene la reabsorción prematura del hueso injertado. Este material ha demostrado consistentemente una excelente tolerancia tisular en el ser humano, sin que se observen reacciones inmunológicas²⁰⁷.

7. MODELOS EXPERIMENTALES DE REGENERACIÓN ÓSEA

Probablemente uno de los componentes fundamentales en los estudios de regeneración ósea sea la adecuada selección del modelo experimental que se va a utilizar.

Los modelos experimentales de regeneración ósea pretenden simular, bajo condiciones controladas, las condiciones que en la naturaleza provocan una insuficiente regeneración ósea. En condiciones ideales estos modelos deberían cumplir las siguientes premisas²⁰⁸:

- En primer lugar, deberían proporcionar el medio ambiente que mejor se ajuste al medio ambiente clínico en el que la intervención a investigar haya de ser aplicada.
- En segundo lugar, debería proporcionar parámetros objetivos y cuantificables (métricos) que permitan valorar el tejido óseo generado (en cantidad, calidad y función), como consecuencia de la intervención realizada.
- Finalmente, deberían ser capaces de predecir y detectar diferencias clínicamente relevantes en los efectos biológicos entre diferentes métodos experimentales.

Como señalábamos en el apartado de Introducción, el elemento característico del tejido óseo es su matriz extracelular mineralizada con una singular hidroxiapatita carbonatada. Es por ello, que la mayor parte de estudios de ingeniería ósea tisular valoran el volumen, distribución y densidad de la matriz mineralizada como parámetro fundamental de resultado (por ejemplo con radiografías o micro CT).

No obstante, el hueso es más que su matriz mineralizada y por tanto es necesario medir otros parámetros que nos permitan realizar un análisis integral de la calidad del hueso neoformado. Como veremos en apartados sucesivos del presente Proyecto de Tesis Doctoral, los estudios histológicos del tejido óseo regenerado completarán dicho análisis cualitativo.

Finalmente, aunque el volumen, densidad y distribución de la matriz mineralizada predigan el comportamiento biomecánico del nuevo tejido óseo, ésta correlación no es del todo perfecta. Por tanto, la comprobación de la funcionalidad biomecánica del hueso neoformado constituye en numerosas ocasiones el nivel más exigente de validación experimental en el campo de la ingeniería tisular ósea.

Los modelos *in vivo*, en animales, son necesarios cuando los sistemas *in vitro* como los cultivos celulares, no son capaces de simular o reproducir adecuadamente las condiciones clínicas reales. Parece lógico por tanto, que para el estudio de fenómenos de osteogénesis en los que intervienen multitud de líneas celulares, factores de crecimiento, fenómenos de angiogénesis, remodelación, inducción biomecánica etc., los modelos *in vitro* sean insuficientes y por tanto el estándar sea el modelo *in vivo* en el animal de experimentación²⁰⁸.

En general en todos los diseños experimentales *in vivo* en el campo de la regeneración ósea, intervienen en mayor o menor medida los fenómenos de osteoinducción, osteoconducción y osteopromoción, descritos en apartados anteriores. A pesar de ello, la

variabilidad en el tamaño físico, anatomía e incluso en diferencias histológicas relacionadas con una especie determinada hacen que ciertos modelos experimentales se ajusten con mayor precisión a los fenómenos de osteoconducción u osteoinducción. Por poner un ejemplo, en el campo de estudio de la osteoconducción, la valoración de un material concreto en términos de su biocompatibilidad, toxicidad, capacidad de osteoconducción de la superficie y tasa de degradación, puede realizarse en defectos de pequeño tamaño de 2 a 5 mm de diámetro máximo utilizando discos o barras sólidas de hasta 1 mm de espesor mínimo. En este contexto las especies más frecuentemente utilizadas son los roedores (ratones, ratas y conejos)²⁰⁹. Por otro lado, en el campo de la osteogénesis, que como bien hemos señalado en apartados anteriores, es el campo fundamental de actuación de la Matriz Ósea Desmineralizada, aunque los roedores también han mostrado una eficacia notable, con la salvedad de los diseños experimentales en los que se utiliza material autólogo del propio animal[5], se tiende a utilizar animales más avanzados en la escala filogenética como perros, ovejas y monos. El principal inconveniente en estos casos suele ser el elevado coste, tanto de adquisición como de mantenimiento del animal.

Existen diferentes variables que el investigador debe conocer y controlar a la hora de realizar una intervención experimental en animales con el fin de minimizar e identificar, si los hubiere, los posibles sesgos o factores de confusión introducidos en el ensayo experimental. Entre ellas destacan: subespecie animal utilizada; criterios de inclusión (edad, sexo, parto); estado nutricional y dieta; actividad física; manejo del dolor, anestesia y control farmacológico; localización anatómica y mecanismo causal del defecto óseo; criterios de punto final y sistemas de medición.

⁵ Esto es debido fundamentalmente a las características histológicas del hueso diafisario de roedores donde la práctica ausencia de hueso trabecular es la nota predominante. Por tanto, la toma de injertos de hueso diafisario para modelos de regeneración con hueso autólogo hace casi imposible la recolección aislada de hueso trabecular a diferencia de animales de mayor tamaño.

Con el fin de limitar los sesgos en nuestra experimentación resultantes de las variables anteriormente expuestas se recomienda seguir cuatro principios fundamentales²⁰⁹.

1. Limitar la variabilidad entre los animales de experimentación tanto como sea posible
2. Elegir aquellos métodos de medición y valoración que sean más sensibles al cambio respecto a la principal variable a estudiar.
3. Utilizar técnicas o materiales en condiciones de tratamiento similares a la práctica clínica real.
4. Utilizar un lecho biológico que se parezca en lo posible a la localización anatómica en que se utilizará en la práctica clínica.

Una vez conocidas estas consideraciones generales para la elección del modelo experimental que mejor se pueda ajustar a nuestro estudio, el siguiente paso es conocer cuál es la teórica aplicación clínica de la investigación traslacional que se está desarrollando.

En este sentido, desde un punto de vista clínico hay dos situaciones en las que la regeneración ósea resulta insuficiente:

- Aquellos defectos, generalmente secundarios a traumatismos, extirpaciones tumorales o defectos congénitos, que por su extensión, grosor o localización sobrepasan la capacidad regenerativa del hueso
- Aquellas situaciones clínicas en las que por la presencia de diversos factores (estrés biomecánico, capacidad regenerativa del individuo, infecciones, etc.) se producen retardos en la consolidación de fracturas o curación con formación de uniones fibrosas o pseudoartrosis, características éstas de las fracturas de los huesos largos.

Ambos grupos tienen en común la insuficiente regeneración ósea espontánea y la

invasión del defecto por tejido fibroso, que al madurar impide que avance la regeneración ósea.

Tenemos por tanto dos modelos básicos de experimentación:

1. Defectos óseos delimitados
2. Modelos de Pseudoartrosis

A continuación desarrollaremos el primer grupo, por ser este tipo de diseños experimentales los que mejor se adaptan al campo de la Cirugía Maxilofacial.

7.1 DEFECTOS ÓSEOS EXPERIMENTALES DELIMITADOS

Como decíamos en el apartado de Introducción, la cantidad de regeneración en un defecto óseo depende en gran parte del tamaño del defecto. En este sentido, para evaluar la verdadera influencia en el proceso de regeneración de un factor determinado, el defecto experimental que se utilice debe ser lo suficientemente extenso como para impedir una regeneración espontánea, que pudiera enmascarar el verdadero potencial de la intervención experimental utilizada.

Un defecto óseo de esa naturaleza se denomina defecto de tamaño crítico (*CSD*)[6]. En esta situación, se considera que la influencia en la regeneración osteogénica de la variable experimental puede considerarse inequívoca. Así, el *CSD* clásicamente se define como el defecto intraóseo más pequeño, en un hueso determinado de una especie concreta, que no regenera espontáneamente durante la vida del animal²¹⁰. En este tipo de defectos, el intento de reparación ósea desde los bordes hacia el centro del defecto resultará en la formación de tejido fibroso, en vez de hueso. Es decir, se supone que la

⁶ *CSD: Critical Size Defect*

regeneración ósea avanza hasta un punto en que cesa, formándose a partir de ahí tejido fibroso.

No obstante, dicho concepto está en continua revisión. La mayor parte de estudios experimentales no se desarrollan a lo largo de la vida del animal de experimentación sino que tienen una duración limitada. Es por ello que diversos autores han redefinido el CSD como aquel defecto óseo que es incapaz de regenerarse adecuadamente durante el tiempo que dure el diseño experimental²¹¹.

El término “adecuadamente” es quizás el aspecto que, quizás todavía, no está claramente definido. Esto es, en la mayor parte de definiciones iniciales del CSD, la mera existencia de un fino puente óseo entre los bordes del extremo, hacía que dicho defecto fuese considerado como “no crítico”. En la actualidad con el desarrollo de las técnicas de estudio en 3D tanto histológicas como radiológicas es posible determinar la regeneración ósea en su totalidad. Es más, la propia calidad del tejido regenerado debe ser otro de los parámetros fundamentales a tener en cuenta.

Finalmente, el tamaño requerido para que un defecto óseo experimental sea válido como defecto de tamaño crítico varía dependiendo de la especie animal, la edad y la maduración ósea, la localización del defecto óseo en el esqueleto del animal, la estabilidad mecánica durante el proceso de regeneración, el tipo de hueso, la presencia de periostio y la presencia de duramadre²¹¹. Todos estos factores van a condicionar la cantidad de regeneración espontánea y la respuesta osteogénica a las condiciones experimentales²¹².

No obstante, el CSD continúa siendo el pilar básico de los modelos translacionales que evalúan y comparan estrategias de reparación ósea. De hecho, en 2009 la ASTM^[7] publicó la Guía Estandarizada para la Evaluación Preclínica In Vivo en Defectos Óseos

⁷ **ASTM:** American Association of Translational Medicine

Segmentarios de Tamaño Crítico²¹³ en la que se analizan en detalle gran parte de los factores anteriormente señalados.

Una vez estudiado el concepto de CSD, pasaremos a analizar la elección del animal de experimentación, la localización del defecto óseo y su tamaño.

7.2 ELECCIÓN DEL ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN

En el campo de investigación de la ingeniería tisular ósea se han utilizado numerosas especies animales², sobre todo ratas, conejos y perros, pero también ratones, gatos, ovejas, cabras, caballos y primates.

Un factor importante a tener en cuenta en cualquier diseño experimental realizado en animales es la extrapolación a la clínica humana de conclusiones obtenidas a partir de animales con mayor capacidad de regeneración ósea.

Como norma general, los defectos óseos en animales inferiores en la escala filogenética se regeneran espontáneamente con mayor rapidez y más completamente que los defectos de animales superiores y el hombre. Los mamíferos pequeños (ratas y ratones) carecen de sistemas haversianos, por lo que la regeneración ósea tras una fractura consiste en la formación de cavidades osteoclásticas que se rellenan con matriz ósea neoformada, pero sin formación de sistemas haversianos secundarios³.

Los conejos son muy interesantes en experimentación ósea, porque combinan la facilidad de manejo de un animal pequeño con un metabolismo óseo más parecido al de los humanos que la rata, incluyendo la existencia de sistemas haversianos. Los gatos evitan cargar sobre sus extremidades fracturadas, por lo que son “buenos pacientes ortopédicos”²⁰⁹. Por el contrario, las ovejas tienden a cargar pronto sobre sus extremidades intervenidas, por lo que son un buen modelo para el estudio de la cicatrización ósea con carga mecánica.

Los perros, especialmente de la raza beagle, y cerdos (sobre todo “minipigs”) se han utilizado con frecuencia en diseños experimentales del área maxilofacial, por su similitud en los procesos de regeneración ósea con el ser humano.. Finalmente los monos son quizás la especie más interesantes, por su similitud genética y anatómica con el ser humano, para el estudio de la regeneración ósea del área maxilofacial¹⁴⁷. No obstante su elevadísimo coste, de adquisición y mantenimiento, restringen de forma notable su utilización experimental²¹⁴.

Tal y como señalábamos en el apartado 3.3 de la Introducción, la edad del animal debe ser otro de los parámetros a tener en cuenta. Esto es así porque los animales en crecimiento presentan una capacidad regenerativa espontánea mucho mayor que los adultos^{6,215}. La explicación parece residir, al menos parcialmente, en la mayor concentración y capacidad proliferativa de las células pluripotenciales del hueso en desarrollo^{48,50}.

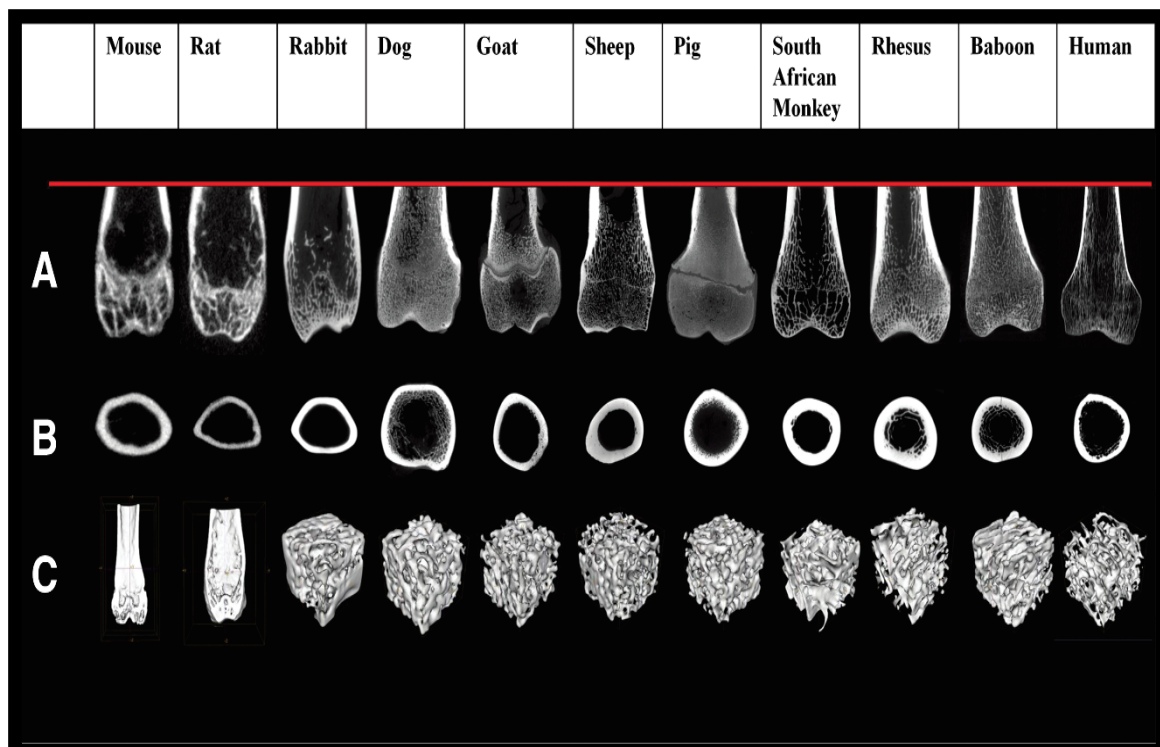


FIGURA 29. Comparación de la microestructura trabecular y cortical de fémures distales obtenida con Micro-CT (resolución de 45 mm) en diez especies diferentes de mamíferos. Adaptado de Muschler et al²⁰⁹, 2014.

En las tablas 5 y 6 se recogen los datos más relevantes sobre los animales de experimentación utilizados en ensayos de regeneración ósea. Adaptado de Muschler et al.²⁰⁹

TABLA 5. RESUMEN DE LAS CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS ANIMALES MÁS FRECUENTEMENTE UTILIZADOS EN INGENIERÍA TISULAR ÓSEA. PARTE I

	RATÓN	RATA	CONEJO	PERRO	CABRA	OVEJA
Nombre Común	Ratón Desnudo	Rata/ Rata Sprague-Dawley	Conejo de Nueva Zelanda	Beagle, Sabueso	Cabra Hispánica	Oveja Doméstica
Nombre Científico	<i>Mus Musculus</i>	<i>Ratus Norvegicus/Rattus</i>	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	<i>Canis familiaris</i>	<i>Capra hircus</i>	<i>Ovis Aries</i>
Peso Adulto	12-30 g	70-400 g	1,5 a 2,5 kg	Beagle, 8,5-16 kg	Media 45 kg	110 kg
Esperanza de Vida	2 años	4 años	9 años	20 años	15 años	10-12 años
Edad de Maduración Esquelética	Crecimiento Continuo	Crecimiento Continuo	10-11 meses	12-18 meses	3 años	15-18 meses
Edad de Maduración Sexual	5-7 semanas	3-5 meses	8 meses	6-12 meses	5-10 meses	6-8 meses

TABLA 6. RESUMEN DE LAS CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS ANIMALES MÁS FRECUENTEMENTE UTILIZADOS EN INGENIERÍA TISULAR ÓSEA. PARTE II

	CERDO	MONO SUDAFRICA NO	MONO RHESUS	BABUINO	HUMANO
Nombre Común	Cerdo Doméstico	Mono Mona	Macaco Rhesus	Babuion Hamadryas	Humano
Nombre Científico	<i>Sus scrofa</i>	<i>Cercopithecus mona</i>	<i>Macaca nemestrina</i>	<i>Papio hamadryas</i>	<i>Homo Sapiens</i>
Peso Adulto	50-350 kg	Macho: 5 kg Hembra: 4kg	Macho: 6,5-12 kg Hembra: 5,5 kg	Macho: 21,5 Kg Hembra: 9,4 kg	76-85 kg
Esperanza de Vida	10 años	20-30 años	30 años	37 años	50-80 años
Edad de Maduración Esquelética	12-14 meses	No disponible	7 años	5 años	16-18 años
Edad de Maduración Sexual	9 meses	2-5 años. Dimorfismo sexual sólo en tamaño	2,5-4 años	4 años. Notable Dimorfismo Sexual	12-14 años. Notable Dimorfismo sexual

7.3 LOCALIZACIÓN DEL DEFECTO ÓSEO

La inestabilidad mecánica suele ser un factor de distorsión en los resultados de los modelos experimentales de defectos óseos de tamaño crítico, por lo que habitualmente se intenta evitar. También es una causa potencial de infección, lo que altera aún más los resultados. Por tanto, la elección de la localización del defecto óseo en el organismo del animal de experimentación dependerá entre otros factores de la estabilidad mecánica resultante.

Así, los defectos óseos experimentales se pueden clasificar en dos grandes grupos:

- Defectos segmentarios, que interrumpen la continuidad ósea, sobre todo de huesos largos de las extremidades, y que por tanto tienen una menor estabilidad
- Defectos no segmentarios, habitualmente de morfología cilíndrica efectuados con trefina. Preferentemente, estos se realizan sobre el cráneo, aunque también pueden efectuarse sobre huesos largos (suelen ser defectos unicorticales) o en la rama mandibular.

7.3.1 Defectos Segmentarios

Los defectos segmentarios son realizados mediante métodos estandarizados. Aunque se consideran modelos altamente reproducibles, hay una serie de fuentes de variación que es preciso conocer: estabilidad mecánica, aislamiento de la cavidad oral (en defectos segmentarios mandibulares), sistemas de fijación esquelética, etc. El medio ambiente de estos defectos segmentarios, generalmente está delimitado en sus extremos por hueso cortical diafisario normal (incluyendo periostio, endostio y médula ósea) y rodeado por una mezcla de músculo, grasa y tejido fibroso. Los de huesos largos son especialmente útiles para el estudio de la regeneración ósea del hueso endocondral, no obstante, cuando se realizan en huesos que soportan carga es necesario colocar sistemas de fijación esquelética que permitan la inmovilización del defecto²¹⁷. Este tipo de sistemas pueden

obviarse cuando el defecto se realiza en huesos que prácticamente no presentan estrés biomecánico como: el peroné de la rata, el radio en el conejo²¹⁸.

Las características uniformes de este tipo de defectos y su fácil accesibilidad al tener una localización anatómica definida, hacen que el análisis de los resultados obtenidos sea sencillo de realizar tanto con técnicas histológicas como radiológicas. Igualmente, con este tipo de diseños es sencillo realizar estudios biomecánicos estandarizados en los que se valore el torque y la rigidez del hueso neoformado.

7.3.2 Defectos No Segmentarios

Los defectos cilíndricos no segmentarios realizados en el hueso frontal o parietal de ratones, ratas y conejos, han sido la base de numerosos diseños experimentales en el ámbito de la regeneración ósea tisular. La principal virtud de este tipo de diseños es su fiabilidad y reproductibilidad. Además presentan la ventaja de disponer de una gran estabilidad mecánica lo que permite obviar la colocación de sistemas de osteosíntesis. Así, no se introduce sesgo alguno en relación con el estrés biomecánico aplicado sobre el defecto. Permite además una correcta valoración radiográfica del defecto y su regeneración sin la interferencia de artefactos radiológicos producidos por los sistemas metálicos de fijación ósea^{216,219}.

El medio ambiente de los defectos cilíndricos craneales es constante. La duramadre vascularizada se localiza en la base del defecto y el hueso cortical con una mínima expresión de hueso trabecular entre medias se dispone circunferencialmente con un grosor uniforme alrededor del defecto. Generalmente las suturas craneales son evitadas. Esta configuración permite una colocación precisa del biomaterial o implante que se va a testar sin la necesidad de utilizar ningún método de fijación interna. El tejido que recubre el defecto (periostio, galea, biomateriales de barrera, etc), varía en relación a la técnica quirúrgica utilizada.

El medio ambiente de los defectos cilíndricos en hueso largos también ha sido definido. Generalmente, la apertura del defecto incluye periostio, hueso cortical y endostio. Posteriormente queda recubierto el defecto por el músculo o grasa supradyacente. La base del defecto, en función de su orientación o si incluye una o ambas corticales puede estar constituido por hueso trabecular, hueso cortical o músculo/grasa²⁸⁰. La calidad del tejido en el interior de este tipo de defectos, en concreto el hueso trabecular, médula ósea y periostio, dependerá en gran medida de la región anatómica, especie animal y edad (Figura 29) . En general, los defectos en la metáfisis de animales jóvenes contienen cantidades abundantes de médula ósea hematopoyética. En contraste los defectos diafisarios tendrán un mayor contenido de grasa o médula ósea amarilla. Este fenómeno se acentúa con la edad. Al igual que sucedía con los defectos cilíndricos craneales, no suele ser necesaria la estabilización mecánica de estos defectos.

Los defectos cilíndricos en general, tienen la particularidad de que por su configuración son especialmente sensibles en la detección de los efectos inducidos por materiales osteoconductivos, factores bioactivos y transplantes celulares. Además, su geometría radial uniforme permite el control y moldeado de diferentes gradientes biológicos que participan en el proceso de osteogénesis. Finalmente, dado que en estos modelos experimentales el patrón de difusión y angiogénesis se dispone desde la periferia hasta el centro del defecto, se consideran especialmente útiles en la valoración de transportes en masa (demanda metabólica, difusión de O₂, gradientes de Factores de Crecimiento); ratio de degradación del implante; transplante celular (supervivencia y migración); y variables que intervienen en la modulación del proceso de angiogénesis.

7.3.3 Presencia de Periostio

El mantenimiento del periostio en el defecto óseo facilita la regeneración ósea, tanto por un efecto mecánico de excluir la entrada de tejido fibroso en el defecto, como por ser

una fuente de células mesenquimales osteogénica²²⁰. Paradójicamente, el uso de membranas de regeneración ósea guiada se justifica precisamente por la exclusión del crecimiento de los tejidos blandos a partir del periostio. Quizá la explicación de esta aparente contradicción consiste en que el mecanismo de acción de las membranas podría pasar principalmente por la estabilización mecánica del lecho de regeneración, y no tanto por el efecto de exclusión celular selectiva. Parece que en los defectos craneales experimentales, la colocación de una membrana de regeneración en el lado dural del defecto también induce la regeneración ósea^{221,222}.

7.3.4 Defectos Craneales

El defecto craneal con trefina ha sido utilizado como modelo experimental desde hace más de 125 años. Como ya vimos en apartados anteriores, ya en 1.889, Senn estudió la regeneración ósea producida en el interior de orificios craneales en perros¹⁴⁹. Desde entonces, los defectos craneales experimentales se han evaluado en distintas especies. Aunque también se utiliza el perro o el mono, la accesibilidad de la rata y del conejo hace que sean los animales más estudiados^{209,218}.

Los defectos craneales son particularmente interesantes en experimentación animal y clínica por su regeneración lenta o incompleta²²³. La relativa falta de hueso trabecular, así como la ausencia de inserciones musculares condicionan una menor vascularización local. El acceso quirúrgico al cráneo es en general sencillo desde el punto de vista quirúrgico. La morfología de la bóveda craneal, básicamente plana o ligeramente curvada, facilita la cuantificación de los resultados, tanto clínicos como histológicos y radiológicos.

En conejos, el diámetro del defecto craneal elegido con más frecuencia es el de 15 mm, que presenta una cicatrización espontánea muy escasa²²⁴. También se han utilizado defectos óseos de menor diámetro, pero las tasas de regeneración espontánea alcanzan

casi el 50%, por lo que numerosos investigadores, no lo consideran defectos de tamaño crítico^{208,209,224}.

Como señalábamos al hablar de las generalidades de los defectos de tamaño crítico existe una considerable controversia en la literatura sobre el tamaño adecuado de las craniectomías en la rata²⁰⁹.

Los diámetros más empleados son 5 y 8 mm, tanto en ratas Wistar como en ratas Sprague-Dawley. Los defectos craneales de 8 mm deben efectuarse en el centro del cráneo, incluyendo ambos huesos parietales. Este hecho presenta varios problemas. Por un lado, la craniectomía incluye la sutura sagital, lo que puede alterar el ritmo de regeneración ósea. Por otro lado, existe el peligro de dañar el seno sagital, lo que suele provocar la muerte del animal, o en todo caso provocar la aparición de un hematoma que también puede interferir en el proceso normal de regeneración.

Finalmente, no es posible efectuar varias craniectomías en el mismo animal para hacer de cada animal su propio control. Por ello, muchos autores prefieren las craniectomías de 5 mm de diámetro^{209,218,225,226}. Según estos autores, la craniectomía de 5 mm cumple también los criterios de un defecto de tamaño crítico sin los inconvenientes anteriormente señalados de la de 8 mm.

7.3.5. Anatomía de la bóveda craneal de la rata

Los límites anatómicos de la bóveda craneal definen ésta como la porción del cráneo que se extiende desde los rebordes supraorbitarios a la protuberancia occipital externa. Incluye el hueso frontal, los huesos parietales, la escama del hueso temporal y del occipital y una pequeña parte de las alas mayores del esfenoides.

Como señalábamos en el apartado 3.1 de la Introducción la bóveda craneal constituye el paradigma de la osificación membranosa. Así, exceptuando el ala mayor del esfenoides, el origen embriológico de todo el cráneo proviene de la osificación

intramembranosa del tejido mesodérmico (aunque en el ratón existe en el embrión un hueso interparietal, de génesis endocondral, que en el adulto es parte del hueso occipital⁵⁵. Por otro lado, salvo en la fase de desarrollo del neurocráneo con la intensa actividad osteogénica desarrollada en las suturas craneales, funcionalmente la bóveda craneal es relativamente inerte debido a una irrigación poco extensa y a la relativa escasez de médula ósea. La irrigación principal proviene de las arterias meningeas, sobre todo la arteria meninge media. Desde el lado externo, hay pequeñas arteriolas que irrigan el cráneo, pero que sólo son relevantes en el área de inserción de los músculos temporales. Por tanto, la zona de bóveda craneal desprovista de inserciones musculares (el hueso frontal, los parietales y la escama del occipital) es la de menor irrigación y menos actividad metabólica.

Microscópicamente, la convexidad craneal de la rata está formada fundamentalmente por hueso cortical, organizado en dos capas, separadas por una fina capa de hueso trabecular. El hueso cortical se dispone en láminas planas paralelas a la superficie del hueso. Como ya ha sido indicado anteriormente, la rata carece de sistemas haversianos.

7.4. REGENERACIÓN DE LOS DEFECTOS CRANEALES EN LA RATA

Se distinguen tres fases en la respuesta tisular a la creación del defecto craneal²²⁸:

Fase inflamatoria. Los primeros diez días se caracterizan por la presencia de inflamación y hematoma. Al principio predominan los leucocitos neutrófilos, que son posteriormente sustituidos por células con apariencia de fibroblastos. El tejido de reparación está bien vascularizado, con numerosas arteriolas. En el tercer día ya existe un patrón de migración celular que se dirige centrípetamente desde los márgenes óseos al centro del defecto.

En las regiones periféricas se identifican dos tipos principales de tejido: fibroblastos en una matriz de colágeno, y hematoma con elementos de fibrina. La región central del defecto contiene células estrelladas con un alto ratio núcleo/citoplasma, y múltiples nucleolos, que ultraestructuralmente parecen ser células osteogénicas. A los siete días, las células con apariencia de fibroblastos son el tipo celular predominante. La matriz colágena se va haciendo más densa. En las regiones periféricas del defecto se puede demostrar calcificación en torno a los osteoblastos, que forman un frente de calcificación en dirección centripeta.

Fase de establecimiento de la no unión. A los diez días, hay una reducción del volumen del hematoma, que anuncia aparición de la no unión. Hay fibroblastos activos (con retículo endoplásmico rugoso prominente) con fibras de colágeno irregularmente orientadas. También hay un infiltrado de células redondas, y una abundante vascularización. Se ven islas de hueso ocasionales en la región periférica, a partir de los márgenes óseos originales. En el frente de calcificación pueden verse osteoblastos que mineralizan la matriz ósea.

En la región central hay pequeños acúmulos celulares que tienen características ultraestructurales de condrocitos, e histológicamente corresponden a cartílago en proceso de calcificación. A los catorce días las fibras de colágeno están más ordenadas, y no hay signos de calcificación de esta matriz extracelular.

Fase de maduración. La fase de maduración comienza el día 21. La matriz extracelular, tanto de la zona periférica como de la zona central del defecto, adopta la apariencia de tejido cicatricial maduro. El colágeno está organizado en gruesos haces entre los fibroblastos. En la zona periférica, los fibroblastos empiezan a orientarse longitudinalmente al defecto, y se aprecian islas de hueso con osteoblastos.

A los 28 días tanto la zona central del defecto como la periférica contienen un tejido conectivo fibroso, que se dispone alrededor de las islas óseas (aisladas) y de las penínsulas óseas (el nuevo hueso a partir del borde de hueso original). Se puede demostrar hueso con tejido medular en el lado dural del defecto. El tejido en general está mucho más orientado que en las fases previas. A los 45 días, el tejido fibroso muestra signos de mayor madurez, con una orientación de las fibras de colágeno y de los fibroblastos casi perfectamente paralela al hueso craneal.

Todos estos hallazgos están descritos en la regeneración que tiene lugar en defectos de 8 mm de diámetro, en los que la formación ósea es mínima. En defectos de 3 ó 4 mm²¹⁰, aunque los patrones temporales de regeneración son similares a los defectos de 8 mm, la cantidad de reosificación es mayor.

8. TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE MUESTRAS

8.1 MÉTODOS HISTOLÓGICOS

Tal y como venimos señalando a lo largo del apartado de Introducción del presente proyecto de Tesis Doctoral, el hueso es algo más que un tejido mineralizado. La matriz desmineralizada, a pesar de su estructura y características únicas representa únicamente una fracción del volumen total del hueso. Por tanto, es necesario valorar otros parámetros distintos del volumen o densidad de la matriz mineral para poder realizar un análisis integrado del tejido que queramos estudiar. Así también debemos valorar, el tejido conectivo, tejido fibroso y médula hematopoyética sin olvidar el componente vascular que aportará, entre otras, gran información sobre la capacidad angiogénica del hueso neoformado. Es por ello que, en la práctica totalidad de ensayos experimentales en el campo de la regeneración ósea el estudio histológico de las muestras obtenidas es parte

indispensable a la hora de analizar los resultados obtenidos por una intervención determinada.

Los estudios histológicos son , por tanto, necesarios para caracterizar el patrón celular del componente mineral así como la cinética de osteogénesis y mineralización. También permiten evaluar las características del tejido no mineralizado incluyendo el grado de respuesta inflamatoria y/o la presencia de residuos del material implantado. Las técnicas de inmunohistoquímica nos permiten caracterizar en mayor detalle las diferentes estirpes celulares presentes, sus marcadores de superficie e incluso los patrones de expresión génica presentes.

Los anteriores parámetros hacen referencia fundamentalmente al análisis cualitativo de las muestras obtenidas. Si bien, éste es importante, no lo es menos la cuantificación del resultado obtenido, fundamental para la realización de extrapolaciones y comparaciones con intervenciones experimentales similares.

Los métodos de cuantificación histológica se denominan de forma genérica, Morfométricos. Cabe realizar una aclaración en este punto. El término Morfometría es un término que engloba tanto la Planimetría como la Estereología. No obstante, en la literatura actual, con frecuencia se utilizan de forma indistinguible Histomorfometría y Planimetría²²⁹.

Si bien, tanto la planimetría o morfometría como la estereología parten en su análisis de estructuras bidimensionales (cristales de microscopio), la primera no trata de obtener a partir de éstas una información tridimensional cuantitativa. La estereología, por su parte, se puede definir como un cuerpo de procedimientos, principalmente geométrico-estadísticos, que pretende obtener información de una estructura tridimensional a partir de secciones bidimensionales^{229,230}.

8.1.1 Histomorfometría

Como señalábamos anteriormente la histomorfometría pretende valorar de forma cuantitativa el tejido. Los parámetros determinados son bidimensionales es decir, únicamente podemos medir longitudes y superficies, nunca volúmenes²³¹.

La nomenclatura histomorfométrica fue elaborada por un comité de trabajo designado por la Sociedad Americana para la Investigación del Tejido Óseo y sus Minerales²²⁹. Se definió como *hueso* la matriz ósea mineralizada; como *osteoides* a la no mineralizada; como *tejido* a ambos huesos y a los tejidos blandos concomitantes, como la médula ósea.

Clásicamente se obtenían las medidas por medio de la rejilla de Merz²³². Hoy se recomienda usar cualquiera de los sistemas de histomorfometría digitalizada comercializados (*Osteometrics Inc, Atlanta, Georgia*), sencillos de utilizar, permiten obtener resultados con gran rapidez.

Los parámetros histomorfométricos óseos en el ámbito clínico se ordenan en cuatro categorías (Tabla 7): estructurales, de resorción, estáticos de formación y dinámicos de formación. Desde un punto de vista experimental, los parámetros histomorfométricos se pueden agrupar en dos grandes grupos: Estáticos y Dinámicos

8.1.1.1. Parámetros Estáticos

Constituyen la primera aproximación en histomorfometría. Como se comentó anteriormente, es un método sencillo de realizar, porque el software disponible actualmente permite realizar estas medidas rápidamente y sin apenas esfuerzo. El parámetro clásico en este tipo de análisis es la **densidad ósea**, que en su valor bidimensional refleja la medida del área ósea. Tridimensionalmente se correspondería con el volumen óseo, que claramente nos aporta mayor información.

Un segundo parámetro, útil en determinadas situaciones es la determinación de la

superficie de hueso en contacto con el tejido adyacente. Este parámetro se correspondería con la longitud en la escala bidimensional y la superficie en la tridimensional. Su valor, calculado directamente sobre la preparación, es la longitud del perímetro que rodea al tejido óseo y que está en contacto con los tejidos que rodean al hueso. No obstante, su determinación tridimensional se aproxima con mayor exactitud a la realidad ya que nos ofrece la superficie real de hueso en contacto con otros tejidos. Resulta muy útil en ensayos experimentales en los que se quiera estudiar la interacción del hueso con un implante determinado (por ejemplo los implantes dentales)

8.1.1.2 Parámetros Dinámicos

El empleo de fluorocromos, entre otros marcadores (vease por ejemplo las tetraciclinas), ha permitido desarrollar una segunda línea de análisis histomorfométrico, al introducir la variable temporal.

A diferencia de las medidas anteriormente descritas, no precisan de la tinción de las preparaciones propiamente dichas. Al contrario, las estructuras son marcadas *in vivo* durante la fase de desarrollo experimental. Estos marcadores deben poseer dos características: capacidad de fijación al calcio a medida que este se incorpora al tejido en formación y capacidad de emitir luz al ser incididos por la luz ultravioleta, utilizando un microscopio de fluorescencia. Los fluorocromos más utilizados son: calceína azul, naranja de xilenol, calceína verde, rojo de alizarina y tetraciclina.

Así, mediante la inyección secuencial de diferentes marcadores podemos obtener el **índice de mineralización**. Se calcula dividiendo la distancia medida en el microscopio de un marcador al siguiente entre el tiempo transcurrido entre las dos inyecciones. Su estimación tridimensional también sería posible obteniendo así el volumen óseo por unidad de tiempo.

TABLA 7. PARÁMETROS HISTOMORFOMÉTRICOS

Abreviatura	Unidad	Significado	Fórmula
Parámetros estructurales			
C. W. i	μm	Anchura de la biopsia	Explicación por sí misma (O.m.)
Ct. Wi	μm	Grosor de las corticales	Suma promedio de distancias entre superficies periosteal y endo-corticales (O.m.)
MdAr	%	Porcentaje de hueso mineralizado en el área total del hueso trabecular analizado	$P(100)/N.C (36)$ (r. M.)
TTAr	mm ²	Area trabecular total del tejido analizado (hueso mineralizado más no mineralizado, más tejidos blandos)	$N. C. \times 0.1516$ (area de r.M.)=mm ² (S.O.)
TbWi	μm	Ancho de la trabécula: la media del ancho de trabéculas en 10 campos	(O.m.)
Tb.Th	μm	Grosor medio de las trabéculas	$(TbWi) \times 0.833^*$ (O.m.)F.C.
Parámetros estáticos de resorción			
Oc.Pm	%	Osteoclastos en el perímetro trabecular: porcentaje de osteoclastos que cubren el perímetro de las trabéculas óseas	$N(100)/N.T$ (r.M.)
E.Pm	%	Perímetro erosionado: porcentaje perimetral de las trabéculas óseas que presentan erosión o melladura con o sin osteoclastos	$N(100)/N.T.$ (r.M.)
Fb.Ar	%	Area de fibrosis peritrabecular: porcentaje total de fibrosis peritrabecular	$P(100)/N. C (36)$ (r.M.)
Parámetros estáticos de formación			
OS	%	Superficie de osteoide: suma de líneas dobles y simples relacionadas con el perímetro trabecular	$100(dLPm + sLPm)/TPm$ (SO)
BS	%	Porcentaje de superficie ósea: suma de porcentajes de hueso trabecular mineralizado y no mineralizado	$MdAr + OAr$ (r. M.)
BS	mm ²	Superficie ósea trabecular en milímetros cuadrados	$(BS\%) TTAr/100$ (r. M.)
OAr	%	Porcentaje de osteoide presente en el área total del hueso trabecular	$P(100)/(N. F \times 36)$ (r.M.)
OS/BS	%	Superficie de osteoide mineralizado en relación con la superficie de hueso trabecular	$\frac{OS \%}{BS \%}$ (SO)
O.Wi	μm	Anchura del osteoide: distancia media entre el depósito de osteoide y la interfase de hueso mineralizado	Explicación por sí misma O.m
OTh	μm	Grosor medio del osteoide en el perímetro del hueso trabecular	$O.Wi (0.833^*)$ O.m con FC
TPm	N.T.	Perímetro total trabecular	Explicación por sí misma (SO)
O.Pm/TPm	%	Porcentaje de osteoide en el perímetro trabecular	$N(100)/N.T$ (r. M.) (SO)
ObPm/TPm	%	Porcentaje perimetral de la trabécula ósea cubierta por osteoblastos relacionado con el perímetro total trabecular	$N(100)/N.T$ (SO)
Ow/Bv	%	Relación del volumen de osteoide con el volumen del hueso. Porcentaje de relación entre el área del osteoide y el área total del hueso trabecular (la relación de áreas y la de volúmenes son equivalentes)	$OAr/BS\%$ (SO)
$\frac{OAr}{BS}$	%		

Abreviatura	Unidad	Significado	Fórmula
Parámetros dinámicos de formación			
MS	μm	Superficie mineralizando: extensión del perímetro trabecular cubierto por dobles líneas de tetraciclina, más de la mitad de la extensión de las líneas simples. Esto indica actividad de mineralización	$dLPm + sLPm/2 = \text{esp.}$ (O.m)
MS/BS	%	Superficie mineralizando relacionada con el porcentaje de superficie ósea. Actividad de mineralización	$(\text{Esp}) \times \text{MS/BS}$ (S.O.)
OAR	$\mu\text{m}/\text{día}$	Velocidad de agregación del osteoide: es la relación entre el grosor del osteoide y el intervalo de tiempo de las marcas	$\text{Oth}/\text{Ir.Lt}$ (r. M.)
MAR	$\mu\text{m}/\text{día}$	Velocidad de agregación del mineral: Distancia media entre las dos líneas de tetraciclina dividida por el intervalo de tiempo del marcador	$\text{Ir.LTh}/\text{Ir.Lt}$ (r. M.)
OMR	%/día	Velocidad de mineralización del osteoide: es el porcentaje de osteoide que mineraliza en la unidad de tiempo. Es la relación entre la superficie mineralizando y la superficie de osteoide divididas por el intervalo de tiempo entre las marcas de tetraciclina	$\text{MS/OS} / \text{Ir.Lt}$ (r. M.)
Aj.Ar	$\mu\text{m}/\text{día}$	Ajuste de la velocidad de agregación: es la relación entre la superficie mineralizando y la superficie de osteoide usando MAR como factor de corrección	$(\text{MAR})(\text{MS})/\text{OS}$ (rM)
Omt	días	Tiempo de maduración del osteoide: intervalo de tiempo entre la síntesis de osteoide y su preparación para ser mineralizado	Oth/MAR (rM)
Mlt	días	Tiempo que dura la mineralización: es el promedio de tiempo entre el depósito del osteoide y su mineralización	$\text{Oth}/\text{Aj.AR}$ (rM)
IM	unidades	Índice de mineralización: índice matemático que facilita el diagnóstico de osteomalacia. Se aplica para medir la velocidad de mineralización del osteoide	$[\text{O.Th} (\mu\text{m}) + \text{OV/BV}(\%)] \times 1.15 - \text{OMR}(\%/D) - \text{BFR/BS} \times 0.15 = \text{U}$
$\frac{\text{BFR}}{\text{BS}}$	$\frac{\mu\text{m}^3}{(\mu\text{m}^2 \times \text{año})}$	Velocidad de formación del hueso: indica principalmente la actividad del remodelamiento óseo. Algunas veces puede indicar ganancia o pérdida ósea	$\frac{\text{MAR} \times \text{M Sx4}(\text{grosor corte}) \times 365}{\text{BS}}$

rm: rejilla de Merz; área de rejilla: 0.1516 mm²; P: puntos que tocan áreas localizadas en la intersección de los semicírculos de la rejilla de Merz; 36: número de puntos y semicírculos de las líneas de análisis de la rejilla de Merz; SO: software osteométrico; Omt: ocular osteométrico; N.C.: número de campos; N: intersección entre el perímetro y las líneas semicirculares de análisis de la rejilla de Merz; N.T.: número de semicírculos de la rejilla que tocan todas las estructuras; dLPm: dobles líneas peritrabeculares de tetraciclina; sLPm: líneas simples peritrabeculares de tetraciclina; IrLt: intervalo de tiempo entre las marcas de tetraciclina; DIrLt: distancia media entre las marcas de tetraciclina; spa: espacios micrométricos que se deben transformar a micras con el factor de corrección del ocular. FC: factor de corrección del grosor. *0.833: $\pi/4$.

Modificado de Velásquez-Forero FH. Histomorfometría de la biopsia previo marcaje y procesada sin descalcificar. Patología 2009;47(2):108-17.

8.1.2 Estereología

La planimetría, como mencionamos antes, no pretende extrapolar los hallazgos bidimensionales al mundo tridimensional. La estereología, por el contrario, parte de la existencia de las estructuras tridimensionales, las cuales son estudiadas mediante la intersección de la estructura con diversas sondas de medida. Estas sondas son

generalmente secciones del objeto y/o retículas de medición de diferentes diseños (puntos, líneas rectas, curvas, etc).

El principio fundamental de la estereología es la necesidad de utilización de métodos no sesgados en la intersección entre la sonda y la estructura. Es decir, los métodos utilizados deben garantizar que cualquier parte de la estructura tenga la misma probabilidad de ser muestreada, para evitar un posible sesgo de selección que impediría la extrapolación de los datos bidimensionales al mundo 3-D.

Lograda la ausencia de sesgo, el siguiente principio estereológico es la estimación de la precisión de la propia medición. Esta precisión, además, debe ser lograda con el menor esfuerzo posible. Como se expondrá más adelante, la precisión en estereología se cuantifica por medio del coeficiente de error (CE)²²⁹.

Cada propiedad geométrica de los objetos (número de objetos, área de superficie de un objeto o grupo de objetos, longitud, tamaño de partículas individuales, además de las propiedades topológicas como la conectividad) requiere un abordaje estereológico diferente. A continuación se expone el abordaje estereológico al cálculo del volumen de un objeto o grupo de objetos.

8.1.2.1 Estereología para la estimación de volúmenes

El principio fundamental del método de Cavalieri es según Gundersen²³⁴ el siguiente: dado un objeto arbitrario, cortado por un plano de sección orientado de forma fija y al azar con respecto a la estructura, el área de sección del objeto en ese plano multiplicado por la altura del objeto perpendicular a ese mismo plano resulta ser un estimador no sesgado del volumen del objeto. La fórmula matemática es idéntica a la conocida fórmula que relaciona el área de la base y la altura de un paralelogramo:

$$\hat{V} = A \cdot h \quad \text{(Ecuación 1)}$$

Siendo \hat{V} el volumen estimado del objeto, A el área de la sección y h la altura.

La más antigua y quizá más popular ecuación propiamente estereológica es la siguiente:

$$V_v = A_A$$

La relación de Glagolev es similar desde el punto de vista formal a la relación anterior:

$$V_v = P_p$$

Esta ecuación significa que la fracción de puntos de una retícula colocada sobre una estructura que coincide con el compartimento de interés es equivalente a la fracción de volumen de ese compartimento en la estructura. Esta es la base de la herramienta probablemente más popular en estereología, llamada el recuento de puntos (“point counting”), y que resulta el modo más eficiente para efectuar el cálculo de la fracción de volumen de los compartimentos de una estructura²³⁰.

8.1.2.2 Estereología basada en modelos

La práctica estereológica suele consistir en contar el número de intersecciones que se producen entre una sonda (en general una retícula de puntos o líneas) y ciertas secciones bidimensionales del objeto tridimensional. Desde sus orígenes como ciencia metalúrgica la estereología se ocupaba generalmente de fracciones de volumen en estructuras de tamaño indeterminado. Esta aproximación a la estereología se denomina estereología basada en modelos (“model-based”), y tiene dos características principales: la primera es que el objeto de estudio es homogéneo y de mucho mayor tamaño que la sonda de medida. La segunda característica es que si se utilizan varias sondas de medida (varias

secciones de la estructura, por ejemplo), éstas podrán ser (o no) independientes unas de otras, ya que la aleatoriedad de la muestra obtenida es una característica inherente a la propia estructura.

Para el estudio de los sistemas biológicos la estereología basada en modelos es inaplicable en muchas ocasiones, ya que los objetos de estudio no suelen ser homogéneos, y por otro lado puede resultar imposible que las sondas de medida sean independientes entre sí. Por todo ello, se ha desarrollado otra aproximación estereológica para los sistemas no homogéneos, denominada la estereología basada en diseños (“design-based stereology”)²³⁶, y utilizada preferiblemente en las ciencias biológicas. Sus principios y ecuaciones son similares en muchos aspectos a la estereología basada en modelos. La diferencia fundamental es que no se presupone que la estructura de interés sea homogénea, con sus componentes aleatoriamente distribuidos. De hecho, el supuesto más habitual es que la estructura en estudio es no homogénea.

Ya que la estructura no tiene una aleatoriedad intrínseca, tendrá que ser la sonda de medición la que se disponga aleatoriamente sobre la estructura. El muestreo aleatorio de la estructura que ha demostrado ser más eficiente (al obtener más precisión con menos esfuerzo) es el llamado muestreo sistemático al azar (“systematic random sampling”). Consiste habitualmente en la obtención de secciones del objeto paralelas entre sí, separadas una distancia fija y conocida.

8.1.2.3 Método de Cavalieri

El método de Cavalieri para “objetos individuales” es un ejemplo de estereología basada en el diseño, y es utilizado para estimar el volumen de una estructura. El término “objeto individual” no se refiere tanto al hecho de que el objeto sea único (sin partes separadas), sino a su consideración de objeto finito, que puede ser muestreado en su totalidad.

El llamado método de Cavalieri se basa en el principio de Cavalieri²³⁵, representado en la figura 30. Consiste en seccionar el objeto de interés a través de planos paralelos entre sí, separados una distancia (T) fija y conocida.

La premisa fundamental, que asegura la ausencia de sesgo en la intersección de los planos y la estructura, es que el primer plano que interese a la estructura debe hacerlo aleatoriamente en un rango de longitud T . Una vez seccionada la estructura de este modo en rodajas, se aplica el principio de Cavalieri a cada rodaja. Sumando todas ellas obtendremos el volumen del objeto entero.

La expresión matemática resulta muy sencilla. Si los planos utilizados para seccionar la estructura son equidistantes con una distancia T entre ellos, el volumen total estimado de la estructura será:

$$\hat{V} = T \cdot \sum_{i=1}^n A_i \quad (\text{Ecuación 2})$$

Siendo A_i el área de cada una de las n secciones.

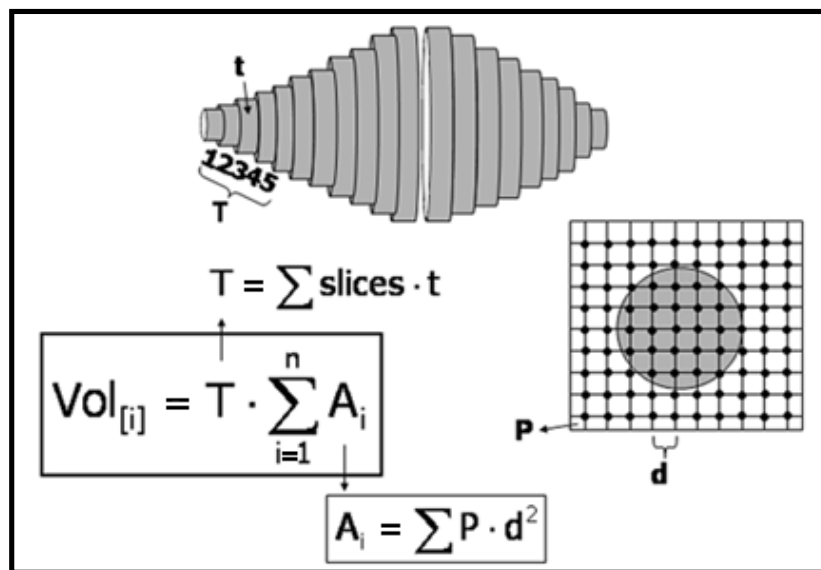


FIGURA 30. Se representa el fundamento geométrico del método de Cavalieri. La muestra es seccionada por planos paralelos entre sí separados por una distancia fija, obteniéndose un número de rodajas. Una vez determinado el volumen de cada rodaja, el volumen del objeto resulta ser la suma de volúmenes de todas las rodajas. Adaptado de: Mandarim-De-Lacerda C²³⁵

8.1.2.4 Recuento de puntos

El área de cada sección es habitualmente estimada por el método del recuento de puntos (“point counting”), que tiene su origen, como hemos mencionado, en la relación de Glagolev ($V_V = P_P$). Este método se basa en el principio de que el número (P) de puntos aleatoriamente lanzados sobre un plano que inciden en el interior de un perfil cerrado contenido en el plano, es un estimador directo de la fracción de área del perfil (A). La fórmula general es la siguiente:

$$\hat{A} = \frac{P(A)}{P(T)} \quad \text{(Ecuación 3)}$$

Donde $P(A)$ es el número de puntos que inciden en el interior del perfil y $P(T)$ el número de puntos totales lanzados.

Por cuestiones de eficacia del muestreo, habitualmente se utiliza una rejilla de puntos cuadrática, con una separación (u) conocida y fija (y corregida según la magnificación empleada). Una vez que se conoce el número de puntos totales que impactan en el objeto (ΣP), el volumen del objeto es estimado directamente mediante la siguiente fórmula:

$$\hat{V}_{(objeto)} = u^2 \cdot h \cdot \sum P \quad \text{(Ecuación 4)}$$

8.1.2.5. Precisión de los datos obtenidos mediante el método de Cavalieri. Cálculo del coeficiente de error (CE) y coeficiente de variación (CV)

Como se ha mencionado anteriormente, una vez asegurada la ausencia de sesgo en la intersección de la sonda y la estructura, la segunda preocupación en estereología consiste en determinar la precisión de la estimación efectuada.

El coeficiente de error (CE) también denominado error estandar relativo, se obtiene conforme a la siguiente fórmula:

$$CE = \frac{Sm}{\bar{m}} \quad (\text{Ecuación 5})$$

Siendo \bar{m} la media aritmética de las distintas mediciones. No obstante, estas fórmulas no tienen en cuenta la naturaleza sistemática de la medición estereológica, por lo que sobreestiman los coeficientes de error verdaderos.

Gundersen y Jensen mostraron en 1987 una manera sencilla y eficiente de calcular el coeficiente de error de las mediciones de volumen de una estructura obtenidas a partir de secciones paralelas entre sí y separadas regularmente. Para ello no es necesario repetir la medición sobre la estructura; el CE puede estimarse a partir de los datos de una sola medición sistemática. De hecho, el método se aprovecha de la misma sistematización del muestreo. Gundersen y Jensen demostraron que la eficiencia del muestreo sistemático no depende de “cuanto” varían las observaciones en las distintas secciones, sino de “cómo” varían.

La fórmula general obtenida por Gundersen²³⁴ es la siguiente:

$$CE = \frac{\sqrt{\frac{1}{12} \left(3 \cdot \sum_{i=1}^n A_i^2 + \sum_{i=1}^{n-2} A_i \cdot A_{i+2} - 4 \cdot \sum_{i=1}^{n-1} A_i \cdot A_{i+1} \right)}}{\sum_{i=1}^n A_i} \quad (\text{Ecuación 6})$$

Donde A_i es el área de la sección i de la muestra ordenada de secciones del objeto, A_{i+1} el área de la siguiente sección, etc.

Esta fórmula del CE nos informa del error introducido en la medición por el hecho de que se toman una serie de muestras paralelas entre sí, y se dejan sin muestrear los espacios intermedios. Es decir, la **ecuación 6** da cuenta de la variabilidad debida al muestreo sistemático. Además, en el cálculo del CE debía incluirse no sólo la variabilidad entre las secciones, sino la variabilidad inducida por el propio método del recuento de puntos en cada sección (el llamado “efecto Nugget”) dado que el método de

recuento de puntos está sujeto a imprecisiones sobre todo en los puntos cercanos a los bordes del objeto, por lo que la morfología de la sección del objeto debe ser tomada en consideración. Puesto que la variabilidad es debida al recuento de puntos, la ecuación reformada incluirá el número de impactos como dato crudo, y no el área asociada a ellos.

La fórmula general para la estimación de la varianza, incluyendo el “efecto Nugget” queda como sigue:

$$CE = \frac{\sqrt{\alpha \left(3 \cdot \sum_{i=1}^n P_i^2 + \sum_{i=1}^{n-2} P_i \cdot P_{i+2} - 4 \sum_{i=1}^{n-1} P_i \cdot P_{i+1} \right) + (1 - 3 \cdot \alpha) \cdot 0,0724 \cdot \left(\frac{\bar{b}}{\sqrt{a}} \right) \cdot \sqrt{n \cdot \sum_{i=1}^n P_i}}}{\sum_{i=1}^n P_i} \quad \text{(Ecuación 7)}$$

El rango de α está entre 1/12 y 1/240, dependiendo de una cualidad matemática denominada “smoothness”, que básicamente se refiere a la presencia de saltos bruscos en las áreas de secciones consecutivas del objeto. Cuando el objeto presenta saltos, el valor que debe asignarse a α debe acercarse a 1/12 (1/12 era el valor en la **ecuación 6**), mientras que si no presenta tales saltos, el valor puede acercarse a 1/240. Esto último, como puede fácilmente deducirse, supone una reducción del CE. La “smoothness” depende no sólo de la forma del objeto, sino sobre todo de la orientación del plano de sección elegido.

Gracias a estas aportaciones matemáticas, se ha demostrado que usando un muestreo aleatorio sistemático en todos los niveles del estudio, se pueden obtener resultados con un coeficiente de error de 0,05 a 0,1 (5 al 10%) contando tan solo entre 100 y 200 puntos en una serie de entre 5 a 10 secciones histológicas, o incluso en una serie de 4 a 8 secciones²³⁰.

Una vez obtenido el CE de la medición en cada individuo ($CE_{(a)}$), se ha de comparar con la variabilidad observada entre los distintos individuos de los diferentes grupos de estudio. El fundamento para esta comparación es ajustar la precisión de las mediciones

en cada individuo a la precisión requerida para encontrar diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos. Para ello debe calcularse la media de los CE de cada grupo de estudio, mediante la siguiente fórmula:

$$CE_{(grupo)} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n CE_{(a)}^2}{n}} . \quad \text{(Ecuación 8)}$$

Donde n es el número de individuos en cada grupo de estudio.

Se ha demostrado que la variación de las mediciones entre los individuos de cada grupo es el resultado de sumar la variación inherente a la variabilidad biológica entre diferentes individuos del grupo y la variación introducida por la propia medición estereológica de cada individuo. Es decir, la variación observada es la suma de las variaciones en los distintos “niveles de muestreo”²³⁶, un muestreo inferior de cada individuo, y un muestreo superior entre individuos.

Siendo CV (coeficiente de variación) la “desviación estándar relativa”, tenemos las siguientes relaciones:

$$CV = SD(x) / \bar{m} \quad \text{(Ecuación 9)}$$

$$CV_{(obs)}^2 = CV_{(verd)}^2 + CE_{(grupo)}^2 \quad \text{(Ecuación 10)}$$

$CV_{(obs)}^2$ es el coeficiente de variación observado entre los individuos de cada grupo experimental, elevado al cuadrado.

$CV_{(verd)}^2$ representa el “verdadero” coeficiente de variación entre individuos de cada grupo experimental, debido exclusivamente a la variabilidad biológica. Lógicamente se trata de un valor teórico, que no puede ser medido directamente.

$CE^2_{(grupo)}$ es el coeficiente de error calculado a partir de la **ecuación 8**, elevado al cuadrado.

Habitualmente se considera que un diseño estereológico resulta válido si

$$CE^2_{(grupo)} \leq \frac{CV^2_{(obs)}}{2} \quad \text{(Ecuación 11)}$$

Cuando el estudio consiste en la comparación de individuos (por ejemplo, antes y después de un tratamiento), habitualmente son necesarios CE muy bajos, para que puedan ponerse de manifiesto las pequeñas diferencias biológicas en cada individuo. Por el contrario, los diseños con grupos formados por diferentes individuos no requieren una precisión tan elevada, ya que la variabilidad biológica en todo caso siempre será mucho mayor, y el “ruido” introducido por la medición estereológica será irrelevante.

Si el $CE^2_{(grupo)}$ contribuye significativamente a la $CV^2_{(obs)}$ según la **ecuación 10**, entonces el diseño estereológico ha resultado ser insuficientemente preciso. Ello puede ser debido a los siguientes factores, solos o en combinación: un escaso número de impactos en cada corte histológico, un número de secciones histológicas insuficientes por individuo, o que el objeto tenga una forma extremadamente irregular (traducido matemáticamente en bruscos cambios en el número de impactos en cortes consecutivos).

La forma más habitual de aumentar la precisión en el método de Cavalieri resulta ser aumentar el número de impactos reduciendo la distancia entre los puntos de la retícula de medición. No obstante, cuando reclutar más individuos no resulta muy costoso, lo más eficiente suele ser aumentar el número de individuos sin alterar el esfuerzo de medición en cada uno. Este hecho ha dado lugar al aforismo conocido entre los estereólogos de “Do more less well”²³⁷ (“Haz más menos bien”).

8.2 MÉTODOS RADIOLÓGICOS

En los estudios experimentales de regeneración ósea, la utilización de sistemas radiológicos en el análisis de las muestras obtenidas siempre debería ser considerado. La adquisición de imágenes de alta resolución de los defectos óseos y los cambios experimentados en ellos a lo largo de la fase experimental, así como la posibilidad de obtener mediciones del volumen o de la densidad del tejido óseo regenerado complementan en gran medida al estudio histológico²³⁸.

Los métodos radiológicos utilizados en la actualidad, abarcan desde las radiografías simples en diferentes planos del espacio hasta los sistemas más complejos de escáneres tomográficos. Evidentemente, a mayor complejidad del sistema radiológico, mayores posibilidades en términos de generación de imágenes de alta resolución y de análisis de información.

El formato de imágenes más utilizado es el DICOM. Éste (**D**igital **I**maging and **C**ommunication in **M**edicine) es el estándar reconocido mundialmente para el intercambio de imágenes médicas, pensado para el manejo, almacenamiento, impresión y transmisión de imágenes médicas. Incluye la definición de un formato de fichero y de un protocolo de comunicación de red. El protocolo de comunicación es un protocolo de aplicación que usa TCP/IP para la comunicación entre sistemas.

Los ficheros DICOM pueden intercambiarse entre dos entidades que tengan capacidad de recibir imágenes y datos de pacientes en formato DICOM. Permite, entre otras funciones, la integración de escáneres, servidores, estaciones de trabajo, impresoras y hardware de red de múltiples proveedores dentro de un sistema de almacenamiento y comunicación de imágenes (<http://dicom.nema.org>)

Los sistemas clásicos de evaluación de las radiografías simples se han hecho con métodos meramente descriptivos, con escalas subjetivas de radio-opacidad²⁷⁸ (con 6

grados de radio-opacidad); o con digitalización de la imagen y medición de la escala de grises, pero siempre en 2 Dimensiones²³⁹.

Los parámetros utilizados con los nuevos sistemas de medición radiológica (micro-CT, CBCT o MDCT) 3D son: Volumen óseo (BV), Contenido mineral del hueso (BMC), proporción volumen óseo frente a volumen tisular (BV/TV), índice trabecular, índice cortical y volumen de médula ósea. De todos ellos, los más utilizados son BV, BMC o BV/TV²⁴⁰.

A continuación nos centraremos en dos sistemas de análisis radiológico de alta resolución: Micro-CT y CBCT.

8.2.1 Micro-CT

La utilización de los sistemas de micro-CT, considerados en la actualidad el patrón oro o gold standard en análisis radiológico está cada vez más extendida entre los laboratorios de investigación biomédica²⁴¹. Los escáneres micro-CT utilizados, con mayor frecuencia para el estudio radiológico de pequeños animales *in vivo* o *ex vivo* (muestras biológicas) permiten obtener imágenes con una resolución nominal por voxel de 50 a 200 μm . Con un mayor grado de complejidad, podemos encontrar sistemas de micro-CT/SPECT y micro-CT/PET que permiten integrar información funcional (Actividad metabólica por ejemplo) en las imágenes convencionales²⁴².

En los últimos años los avances tecnológicos tanto en los sistemas de emisión como de detección de rayos-x han permitido ampliar la utilidad teórica de los sistemas de micro-CT. En este sentido, son de especial interés los sistemas de detección basados en el conteo de fotones y de resolución de energía.

Los detalles de estos sistemas, escapan del propósito introductorio de este apartado. No obstante, hay que decir que todos ellos pretenden maximizar la escala dinámica de

grises del micro-CT y así incrementar aún más el contraste de imagen hasta obtener resoluciones en el ámbito submicroscópico. Al mismo tiempo, el objetivo secundario de estos sistemas es el de optimizar la obtención de imágenes con la máxima resolución y la menor dosis efectiva posible.

Como sucede con casi todos los sistemas de alta resolución, el principal inconveniente de los sistemas de micro-CT es su elevado coste en comparación con otras técnicas radiológicas.

Finalmente y aunque no suele ser un parámetro a considerar en gran parte de los estudios de regeneración ósea, la dosis efectiva de radiación emitida por estos sistemas es alta comparativamente hablando con otros sistemas como el CBCT, que posteriormente será descrito²⁴³.

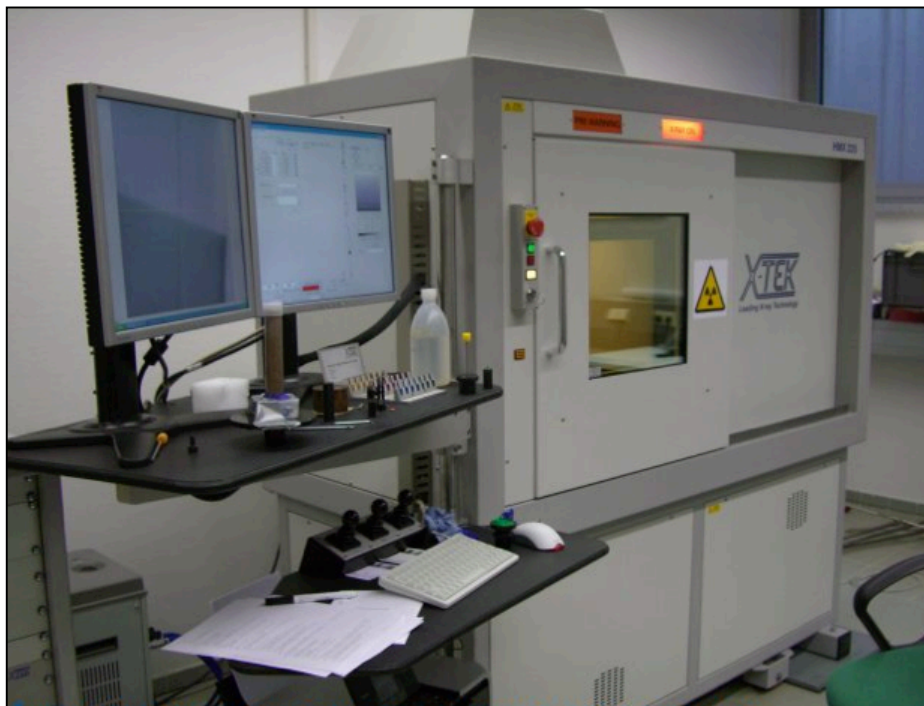


FIGURA 31. Sistema convencional de Micro-CT

8.2.2 CBCT

La tomografía computadorizada de haz cónico, en inglés, Cone Beam Computed Tomography (en adelante CBCT), o tomografía digital volumétrica fue desarrollada a finales de los años noventa con el fin de obtener escáneres tridimensionales del esqueleto maxilofacial con una dosis de radiación menor que la Tomografía Computadorizada (en adelante TC)^{244,245} revolucionando la imagen del complejo craneofacial y ofreciendo una alternativa a la imagen convencional intraoral y panorámica, que elude la superposición y los problemas de distorsión de imágenes. Los principales campos de aplicación del CBCT incluyen: implantología dental, ortodoncia y Cirugía Oral y Maxilofacial²⁴⁶.

El primer sistema de TC fue desarrollado por GN Hounsfield en 1.967. Desde aquél, se han desarrollado seis generaciones distintas hasta los modernos sistemas de TC multicorte de alta resolución. En los sistemas convencionales las imágenes emitidas por el objeto irradiado son capturadas en la pantalla de un sistema detector. Dichas imágenes, al estar compuestas por múltiples planos que luego deben integrarse mediante un software apropiado y precisan para su obtención de una considerable cantidad de radiación. Otras limitaciones inherentes a este tipo de sistemas son el coste y el gran espacio físico necesario para alojar todos los dispositivos²⁴⁷.

La imagen de CBCT difiere del TC en que el volumen tridimensional de los datos es adquirido en el curso de un sólo barrido del escáner, usando una simple relación directa entre el sensor 2D y la fuente de radiación, al rotar sincrónicamente alrededor de la cabeza del paciente, en el caso de que se explore el área maxilofacial. De forma característica el haz de rayo se proyecta cónicamente y gira alrededor del objeto de estudio o isocentro. La mayoría de sistemas utilizan arcos de rotación de 360°, no obstante algunos utilizan únicamente arcos de 180°, disminuyendo así aun más la dosis total de radiación²⁴⁸.

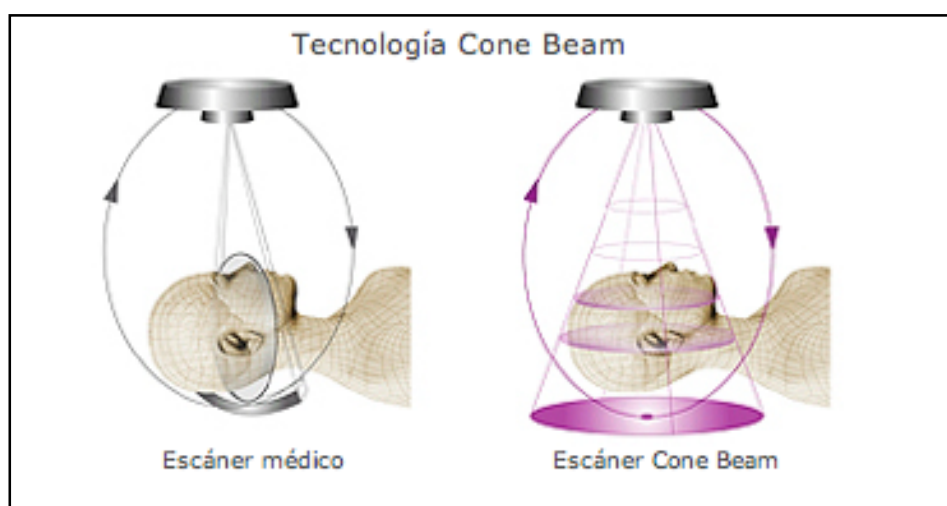


FIGURA 32. Representación esquemática que muestra las diferencias entre el haz emitido por un sistema convencional de CT (imagen de la izquierda) frente a un sistema de haz cónico o CBCT (imagen de la derecha)

Dicho haz cónico se genera en el tubo de vacío de rayos-x. La calidad del mismo dependerá del espectro de rayos-x utilizado, que a su vez está definido por el pico de voltaje (kVp), el material del que está formado el ánodo y los métodos de filtración. La cantidad de rayos-x se relaciona con la corriente anódica (mA) y el tiempo de exposición. Finalmente, la colimación define la anchura y la altura del rayo primario y por tanto el tamaño del FOV (Field of View)²⁴⁹.

Las imágenes recibidas en el detector son agrupadas y transformadas en el ordenador en datos volumétricos o voxels (reconstrucción primaria). Éstos podrán ser visualizados como cortes multiplanares reformateados en 2D o en 3D utilizando sistemas de reconstrucción de superficie o de renderización de volúmenes. Cada voxel tiene un determinado valor de escala de grises, asignado por el algoritmo de reconstrucción al combinar la información recogida de todas las proyecciones obtenidas²⁵⁰.

Una de las mayores controversias actuales hace referencia a la extrapolación de los resultados obtenidos con la escala de grises del CBCT frente a las unidades Hounsfield, obtenidas a partir de los TC. Existe una tendencia generalizada en los clínicos a que dado la gran resolución 3D de las imágenes obtenidas con CBCT se cree que los resultados

obtenidos en su escala de grises son directamente extrapolables en términos de densidad mineral por poner un ejemplo. Lamentablemente esto, todavía no es así. Numerosos estudios han demostrado variaciones en las mediciones de densidad ósea obtenidas a partir de la gradación de grises obtenidas con CBT²⁵⁰. Ello es debido a varios factores tales como: el tamaño limitado del campo de irradiación, una relativa cantidad de radiación dispersa que distorsiona la imagen final y finalmente la relativa baja potencia todavía de los algoritmos de reconstrucción de imágenes, en comparación con aquéllos de los sistemas de TC multicorte²⁵¹⁻²⁵².

Este fenómeno no condiciona su posible utilización en ensayos experimentales de regeneración ósea, pero sí condiciona su extrapolación o comparación con medidas obtenidas en unidades Hounsfield^{253,254}. Por otro lado, cada vez más, se está produciendo un cambio en la tendencia de las mediciones radiológicas a efectuar en ensayos experimentales como el de la presente Tesis Doctoral. Así, cada vez más se tiende a valorar el papel del micro-CT y del CBCT en términos de medición de la arquitectura trabecular, expresado entre otros, como ya vimos anteriormente con el BV frente a las puras mediciones de la densidad ósea obtenida en el compartimento a estudiar.

Como veremos en sucesivos apartados, esto es de vital importancia en este proyecto, toda vez que se comparan biomateriales con diferentes densidades, donde la simple medición de las densidades, podría inducir a error²⁵⁵.

En términos generales, el algoritmo más utilizado en la práctica clínica del CBCT es el modificado de Feldkamp que utiliza un sistema de retroproyección filtrada²⁴⁷. Recientemente se están desarrollando sistemas de reconstrucción reiterativa que se basan en la realización de ciclos consecutivos de reconstrucción y reproyección comparando los datos obtenidos con datos simulados. Teóricamente permite disminuir los artefactos, pero tiene el gran inconveniente de que precisa sistemas computadorizados de

gran potencia²⁴⁸.

El tamaño del FOV es variable. Así podemos encontrar escáneres CBCT con FOV de gran volumen [**i-CAT** (*Imaging Sciences International, Hatfield, PA, USA*) y **Newtom** (*QR, Verona, Italia*)] que son capaces de capturar el esqueleto maxilofacial completo. Algunos incluso como el i-CAT permiten ajustar la altura del FOV cilíndrico para capturar sólo una zona determinada. Tiene la ventaja de reducir la dosis de radiación a la zona concreta que se quiere estudiar.

El FOV más pequeño se correlaciona con una dosis efectiva menor de radiación de 7,4 μSv . Los escáneres CBCT de limitado volumen (**Accuitomo 3D**, *J Morita Corporation, Osaka, Japon*) pueden capturar un volumen de datos de 40 mm de alto por 40 mm de diámetro, similar a la anchura y altura de la radiografía convencional periapical²⁴⁹. Los tiempos de adquisición con CBCT varían entre 10 y 40 segundos en función del tipo de escáner usado y de los parámetros de exposición seleccionados.

A favor del CBCT frente al TC convencional destaca su menor coste y la menor dosis de radiación precisa para la obtención de un estudio equivalente²⁵⁶. Por otro lado el CBCT destaca por su gran exactitud de reproducción tridimensional de la estructuras, no de la escala de grises, tal y como vimos anteriormente²⁵⁷. Explicaremos esto en mayor detalle. Como comentamos anteriormente las imágenes 3D obtenidas en el CBCT están constituidas por voxels en lugar de pixels que son los que determinan las imágenes digitales 2D. El tamaño de cada voxel depende de su altura, anchura y grosor o profundidad y es el elemento más pequeño del volumen de la imagen radiográfica 3D. En TC los voxels son anisotrópicos (no idénticos en todos los planos). La altura de éstos depende del grosor del haz de TC (grosor del corte), lo que limita la precisión de imágenes reconstruidas en determinados planos (por ejemplo, en el sagital) puesto que depende de la distancia entre dichos cortes (gap) programada en la adquisición. Por el

contrario en los CBCT, los voxeles son isotrópicos, es decir, iguales en longitud, altura y profundidad, lo que permite unas mediciones geométricamente precisas para los datos de CBCT en cualquier plano²⁵⁵.

Los cortes tomográficos, son tan gruesos como el grosor de un voxel y permiten su visionado en diferentes posiciones. Una opción es ver las imágenes en los tres planos ortogonales: axial, sagital y coronal en una única pantalla, permitiendo al clínico una visión tridimensional real del área de interés.

Seleccionando y moviendo el cursor en la imagen se alteran simultáneamente los cortes en los otros planos reconstruidos permitiendo el cambio dinámico en tiempo real para ver el área de interés. De acuerdo a los estudios realizados por diversos autores, la calidad de la imagen de los escáneres de CBCT es superior a la TC helicoidal para el análisis de tejidos dentales duros en la zona maxilofacial²⁵⁵. Ludlow y cols²⁵⁶ concluyeron que el CBCT permitía la obtención de imágenes precisas en dos y tres dimensiones independientemente de la orientación de la cabeza y que por otro lado también permitía obtener con fiabilidad mediciones lineales del esqueleto maxilofacial.

TABLA 8. COMPARATIVA DE DOSIS EFECTIVA (Modificado de Ludlow y cols, 2003)

301

EQUIPO	DOSIS EFECTIVA EN μ SV
i-CAT	34-100
TC maxilar-mandibular convencional	300-800
Panorámica	13

Así mediante el empleo de esta técnica en el presente proyecto de Tesis Doctoral se pretendía por un lado obtener imágenes de la mayor calidad y fiabilidad posible del defecto óseo regenerado y por otro lado poder compararlo con los datos obtenidos a partir

de los estudios histológicos.

Como señalábamos anteriormente una de las mayores ventajas del CBCT frente al CT es la menor dosis efectiva con el primero. Aunque las dosis efectivas de los diferentes sistemas de CBCT varían en función del FOV, en términos generales se considera que oscilan en el rango de dosis de una radiografía panorámica (aproximadamente 10 veces menor que un TC convencional). Para el estudio de estructuras de pequeño tamaño los sistemas ideales de CBCT son aquellos de FOV limitado (de 4 a 8 cm). Con ellos puede llegar a obtenerse una resolución de voxels isotrópica de $100\text{ }\mu\text{m}$ ^{257,258}.

Teóricamente la aplicación del CBCT en modelos experimentales de regeneración podría permitir valorar de forma precisa fiable el volumen de hueso regenerado sin la necesidad de sacrificar al animal, con un menor coste que los sistemas de TC convencional y con una menor dosis efectiva, que en modelos de radiosensibilidad podría tener importancia^{259,260}. Aunque existe escasa literatura al respecto, cada vez más se busca la comparación de los sistemas de micro-CT (considerados el gold standard) con los sistemas de CBCT o de TC multicorte, obteniéndose resultados equiparables en términos de cuantificación de volumen óseo, BSI (Índice de resistencia ósea) y BMD (Densidad mineral ósea)^{240,255}.

HIPÓTESIS

Y

OBJETIVOS

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Los procesos de regeneración ósea pueden ser influidos por multitud de factores, algunos de los cuales, tales como las proteína óseas morfogenéticas o el TGF- β están contenidos en la matriz ósea.

Aunque experimentalmente la utilización de matriz ósea desmineralizada (DBM), de forma aislada o en combinación con diferentes *carriers*, hueso autólogo o incluso BMP recombinante humana, está ampliamente extendida, la utilización clínica de la misma es cuanto menos limitada. En este sentido, uno de los principales problemas que el clínico se encuentra a la hora de elegir entre un producto u otro es la práctica ausencia de datos objetivos y estandarizados del potencial osteogénico relativo a cada uno de estos productos.

La hipótesis central de nuestro estudio ha sido que la regeneración ósea en defectos de tamaño crítico de cráneo de rata puede ser potenciada mediante la utilización de matriz ósea desmineralizada humana con *carrier* de hialuronato sódico (DBX®).

Por tanto, los objetivos de nuestro estudio han sido:

Objetivo Principal

1. Determinar el verdadero potencial osteogénico de la matriz ósea desmineralizada humana con carrier de hialuronato sódico (DBX®) en defectos de tamaño crítico de cráneo de rata en comparación con el potencial de la matriz ósea desmineralizada de origen equino (Colloss-E®) y una apatita carbonatada derivada del hueso bovino con propiedades osteoconductoras (Bio-Oss®).

2.Objetivos Secundarios

3. Confirmar la validez del modelo de craniectomía de 5mm de diámetro en hueso parietal rata como modelo válido de defecto de tamaño crítico para estudios de regeneración ósea.

4. Valorar la eficacia del análisis radiológico de la regeneración ósea mediante tomografía de haz cónico como método complementario del análisis histológico y estereológico y como alternativa a los sistemas clásicos de análisis radiológico.

5. Valorar la congruencia interna del potencial osteogénico de la matriz ósea desmineralizada entre diferentes lotes de producto.

6. Valorar las características adsorptivas y de manejo quirúrgico de los diferentes compuestos utilizados.

MATERIAL

Y

MÉTODO

1.CONSIDERACIONES GENERALES

1. El estudio experimental se ha realizado en el laboratorio de experimentación animal de la Unidad de Cirugía Experimental del Hospital Universitario La Paz de Madrid.

2. El estudio radiológico de los especímenes se ha efectuado en el Centro ICAT Madrid (Núñez de Balboa, Madrid).

3. El estudio anatomopatológico ha sido realizado en el servicio de Anatomía Patológica del Hospital La Paz de Madrid, tanto en el apartado de técnicas como de interpretación de los resultados.

4. El manejo de los animales de experimentación, incluyendo su estabulación, manejo quirúrgico y sacrificio se ha realizado de acuerdo a las directrices pautadas según el Real Decreto 1201/2005 y la Ley 32/2007 de la Comunidad Autónoma de Madrid.

5. El diseño y realización del presente proyecto de Tesis Doctoral recibió la aprobación de la Comisión de Bioética del Hospital Universitario La Paz de Madrid.

6. El responsable del presente proyecto experimental con autorización de grado Categoría C para la dirección de Proyectos de Investigación Animal, ha sido el principal autor del presente proyecto de investigación: José M^a López-Arcas.

2. EL MODELO EXPERIMENTAL

2.1 ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN

Para el presente proyecto de Tesis Doctoral se han utilizado ratas albinas del tipo Sprague Dawley (*Ratus Norvegicus*), (*Charles River Laboratory España, Cerdanyola, Barcelona, España*).

La rata Sprague Dawley ha sido escogida como animal más idóneo para este trabajo, por presentar las siguientes características:

- Tamaño reducido, que permite adaptarse a las capacidades y características de los estabularios del centro.
- Gran resistencia a las infecciones y a las intervenciones quirúrgicas, no siendo estrictamente necesaria la práctica de éstas en condiciones de esterilidad.
- Similitud anatómica y embriológica entre la calota craneal de la rata y del hombre.
- Animal empleado por otros muchos autores en trabajos sobre inducción ósea por su buena respuesta a la matriz ósea desmineralizada, en implantes ortotópicos y heterotópicos.
- Animales de ciclo vital corto, con un índice de actividad metabólica cinco veces superior al del hombre, con la consiguiente reducción de tiempo para obtener resultados.
- Facilidad para su ubicación posterior, que permite mantenerlos en grupos de cuatro a cinco animales por jaula.
- Su coste relativamente bajo, tanto de adquisición como de manutención.

En nuestro estudio se han utilizado ratas macho adultas con el fin de evitar cualquier sesgo inducido por la edad o el sexo.



FIGURA 33. Rata albina Sprague Dawley (*Ratus Norvegicus*)

2.2 NUTRICIÓN Y CUIDADOS

La rata de laboratorio está alimentada con unos piensos específicos, de los que se conoce su composición, tanto cualitativa como cuantitativamente. El pienso se presenta en forma de cilindros, siendo del tipo PANLAB A.04. La alimentación es "ad libitum", es decir, dejando que el animal disponga libremente del alimento según sus necesidades, las cuales dependerán, en términos generales de las fases de crecimiento, gestación o lactancia. Además, el animal dispone de agua corriente, contenida en unos "biberones" especiales.

La rata de laboratorio, antes y después de la cirugía, se mantiene ubicada en jaulas de cuatro individuos por unidad en un estabulario del tipo Rack Ventilado, que disminuye la contaminación cruzada entre jaulas y les permite cierta libertad de movimientos. Al menos 2 veces por semana se realizaba una limpieza de las jaulas.

Se mantienen unas condiciones ideales de temperatura (20-22°C), de humedad (60-70%) y de luminosidad (12 horas al día).

La curva de edad-peso de estos animales sería la siguiente:

- A los dos meses pesan 235 gramos
- A los tres meses pesan 420 gramos
- A los cuatro meses pesan 510 gramos

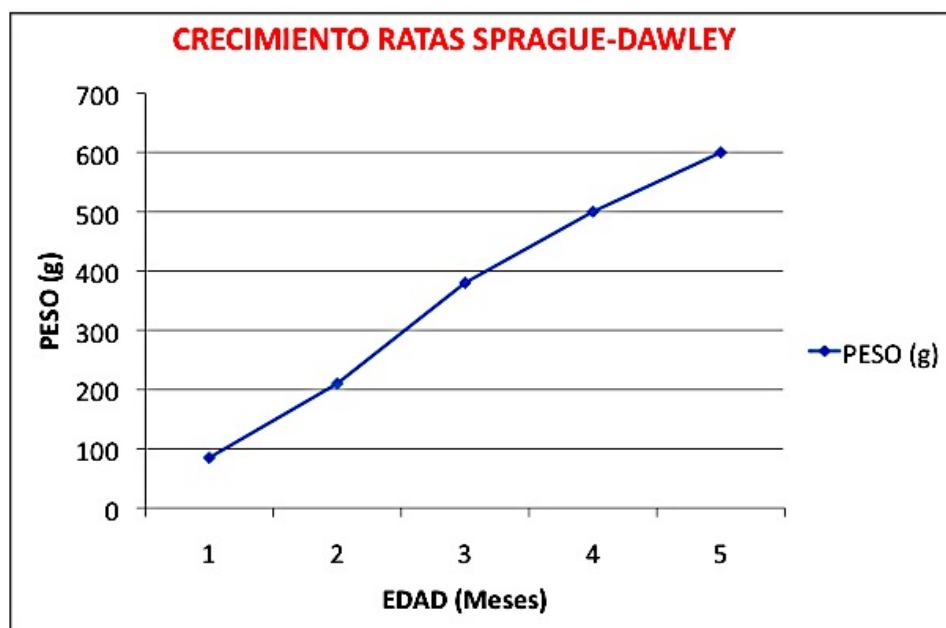


FIGURA 34. Curva de Crecimiento de Ratas Sprague-Dawley

2.3 NÚMERO DE ANIMALES EMPLEADOS Y DISTRIBUCIÓN DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO

Se utilizaron 55 ratas Sprague Dawley (*Ratus Norvegicus*), machos adultos, de 3-4 meses de edad, de entre 375 a 420 gramos de peso. La distribución de los mismos se recoge en la siguiente tabla:

TABLA 9. DISTRIBUCIÓN DE ANIMALES EMPLEADOS EN EL PROYECTO EXPERIMENTAL

DISTRIBUCIÓN DE ANIMALES EMPLEADOS		
	Nº Animales	Peso Medio (g)
<i>Técnica Quirúrgica</i>	15	398,7
GRUPOS EXPERIMENTALES		
<i>Grupo 1: Control</i>	10	402,15
<i>Grupo2: DBX®</i>	10	405,23
<i>Grupo 3: COLLOSS®</i>	10	401,18
<i>Grupo 4: BIO-OSS®</i>	10	404,57

2.3.1. Grupo Técnica Quirúrgica

Inicialmente se emplearon 15 animales para poner a punto la técnica quirúrgica por el investigador principal. Aunque de apariencia técnica sencilla, la ejecución de la misma dentro de los estándares de reproductibilidad del modelo experimental planificado requería de un entrenamiento previo en técnicas de fresado microquirúrgico.

Una vez puesta a punto la técnica se procedió al cálculo del número de animales necesario para el presente proyecto de investigación. Basándonos en las experiencias de Arias²³⁸ se tomó como tamaño muestra de referencia 10 animales por grupo de experimentación.

2.3.2 Grupos experimentales

Se utilizaron 40 animales, distribuidos en 4 grupos con 10 animales cada uno. Todos los animales del grupo experimental fueron sacrificados a las 12 semanas. Cada grupo de diez animales fue adscrito a un grupo de experimentación de forma aleatoria, antes de proceder a la intervención quirúrgica. Excepto en el grupo Control, en el que el orificio de craniectomía se dejó vacío, en cada grupo se introdujo un material de relleno diferente en el orificio de la craniectomía.

Se agrupó a los animales del siguiente modo (ver también **Tabla 9**):

Grupo 1. (“Control”). 10 animales. El orificio de craniectomía se dejó vacío.

Grupo 2. (“DBX®”). 10 animales. Se colocó DBX® en el orificio de craniectomía. El DBX® fue administrado en forma de gel, previamente distribuido en alícuotas estériles, obtenidas a partir de dos lotes diferentes y distribuidas aleatoriamente, en

cantidad suficiente para rellenar el defecto óseo, sobrepasando ligeramente el nivel del hueso craneal nativo.

Grupo 3. (“COLLOSS®”). 10 animales. Se colocó COLLOSS-E® en su forma comercializada liofilizada de consistencia algodonosa sobrepasando ligeramente el nivel del hueso craneal nativo, con especial cuidado de no sobrecompactar el material. Se utilizaron dos lotes diferentes del material que de similar forma al grupo 2 fueron distribuidos aleatoriamente en los animales del grupo experimental. Los instrumentos para colocar el COLLOSS® debían estar previamente humedecidos con suero salino estéril para evitar la excesiva adherencia del material.

Grupo 4. (“BIO-OSS®”). 10 animales. Se colocaron gránulos de BIO-OSS® directamente en el orificio de craniectomía sobrepasando ligeramente el nivel del hueso craneal nativo.

2.4 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

2.4.1 Material de investigación

- **DBX®.** Producto disponible comercialmente, dispensado en diferentes fórmulas. En el presente proyecto experimental se utilizó la formulación DBX-Putty con carrier del 93% de ácido hialurónico (*Depuy-Synthes, CA, USA*).
- **Collos E®.** Producto disponible comercialmente dispensado en formulación estéril de textura algodonosa deshidratada. (*Ossacur AG, Oberstendeld, Alemania*)
- **Bio-Oss®.** Producto disponible comercialmente, dispensado en gránulos estériles de esponjosa de 0,5-1mm de tamaño medio (*Geislitch Biomaterials, Geislitch Pharma AG, Switzerland*)

2.4.2. Material para la Intervención quirúrgica

- Material quirúrgico.

- Fórceps de Castroviejo
- Pinzas de relojero
- Tijeras de Wescott
- Periostotomo
- Excavador dental pequeño
- Mosquitos
- Micromotor dental para implantología WH con contraángulo de velocidad variable y dispensador de suero automático
- Trefina con diámetro externo de 5 mm (Mozo-Grau SL, Valladolid) de carburo de tungsteno y Trefina Diamantada, adaptable al contraángulo

- Material fungible.

- Bisturíes desechables con hoja del número 15
- Suturas de polyglactin 910 (Vicryl®) con aguja cilíndrica de 6/0
- Betadine®

- Medicación.

- Suero salino fisiológico (NaCl al 0,9%)
- Solución de cloruro potásico (KCl 2M)
- Solución de cefazolina (Kefol®)
- Solución de buprenorfina (Buprex®)
- Isoflurano (Forane®)
- Oxígeno

- Otro instrumental.

- Equipo de anestesia inhalatoria preparado para dispensación de isoflurano y oxígeno
- Báscula para pequeños animales
- Báscula de precisión
- Maquinilla eléctrica de afeitado

2.4.3 Material para el procesamiento de las muestras

- Guillotina para pequeños animales
- Tijeras de Metzemaum
- Tijeras de Mayo
- Pinzas de disección
- Bisturí con hoja del número 20
- Solución de formaldehído al 10% tamponado
- Paramoles
- Cassetes para colocación de las muestras histológicas.
- Soluciones de porcesado de tejidos: alcoholes, xileno, formalina, parafina
- Microtomo digital semiautomático LKB-Ultratome V.
- Tintes histológicos: hematoxilina de Harris, eosina Y y Tricrómico de Masson.
- Talladora TM-60 de bloques de resina
- Procesador automático de parafina (Leica TP 1020)
- Dispensador de parafina Oxford Trade
- Entellán (medio de montaje rápido para microscopía de Merk)

2.4.4 Material para la histología y estereología

- Microscopio óptico Zeiss®

- Proyector de mesa de preparaciones histológicas
- Rejilla cuadriculada con 5 mm de separación entre puntos

2.4.5 Equipo radiológico

- ICAT Precise 2011 con interfaz PACs y DICOM 3.

2.4.6 Ordenador, programas informáticos, cámara fotográfica

- Ordenador iMAC 21” 2.016.
- Programas Excel y Word del paquete Office 360 2.017.
- Programas de estadística SPSS versión 15.0
- Cámara fotográfica digital Nikon® D60 (12 megapíxeles de resolución) equipada con objetivo zoom 18-250 Tamron®.
- Software Osirix® versión 8.0.2 de 32 bits para visualización y edición de archivos DICOM.

2.4.7. Procedimiento quirúrgico.

Todas las cirugías fueron realizadas con técnicas asépticas. Tras una cuarentena mínima de 7 días, las ratas eran anestesiadas inicialmente mediante inmersión en cámara de anestesia inhalatoria con Isoflurano (Forane®) al 4%.

El mantenimiento se realizaba con Isoflurano al 0.50% con flujo de oxígeno a 1 L/min administrado mediante sistema abierto de anestesia inhalatoria para roedores (**Figura 35**).



FIGURA 35 . Sistema de Anestesia inhalatoria para roedores.



FIGURA 36. Campo quirúrgico para el procedimiento experimental.

Una vez anestesiada la rata se administraba un lubricante ocular en cada ojo para protegerlos durante el afeitado y la intervención quirúrgica. Posteriormente, se procedía al pesaje del animal y a su registro en una hoja quirúrgica.

A continuación se procedía al afeitado y lavado de la cabeza de la rata con Betadine y a su posicionamiento en una tabla aséptica en decúbito prono con las extremidades extendidas y fijadas mediante esparadrapo a la tabla. Al igual que las extremidades, se realizaba la fijación de la cabeza en hiperextensión ajustando el sistema de anestesia inhalatoria para roedores.

El procedimiento quirúrgico, realizado en todo momento bajo el microscopio quirúrgico con 25 y 40 aumentos, comenzaba con la realización de una incisión cutánea en línea media de unos 3 cm de longitud, a lo largo de la sutura sagital desde el nasión hasta el occipucio.

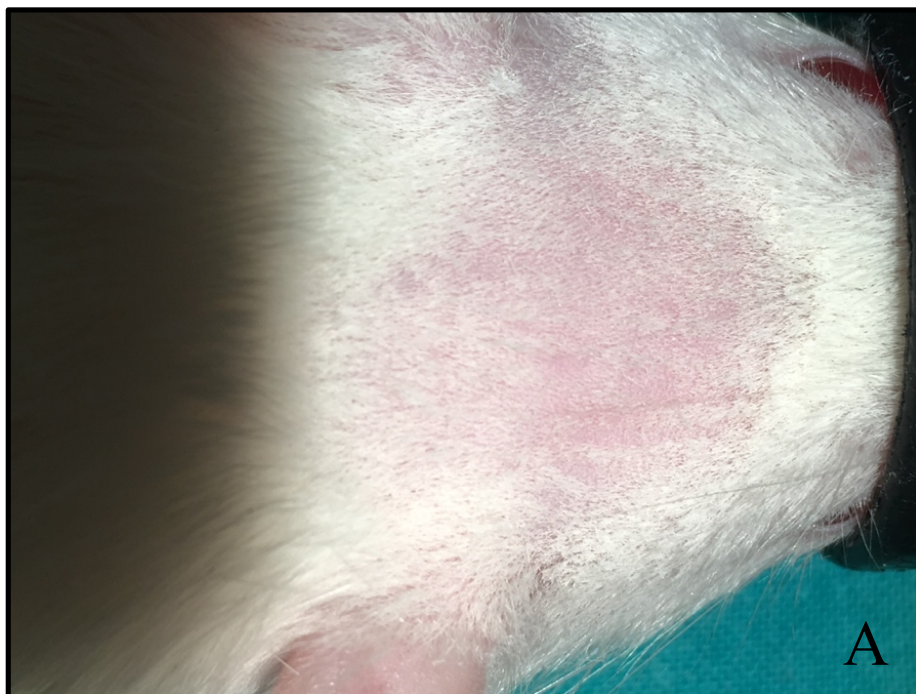




FIGURA 37. A: Exposición desde el nasion hasta el occipucio. B: Incisión longitudinal de la piel hasta el periostio.

Los tejidos superficiales eran separados del periostio mediante iseccción con tijera de Iris. Posteriormente se incidía el periostio para-sagitalmente de tal forma que la ulterior sutura perióstica no coincidiese con el orificio de la craneotomía. Seguidamente se procedía al despegamiento subperióstico a ambos lados hasta exponer completamente los huesos parietales siendo los límites: lateralmente hasta la cresta del temporal, anteriormente varios milímetros en el hueso frontal, y posteriormente varios milímetros en el hueso occipital (**Figura 38**).

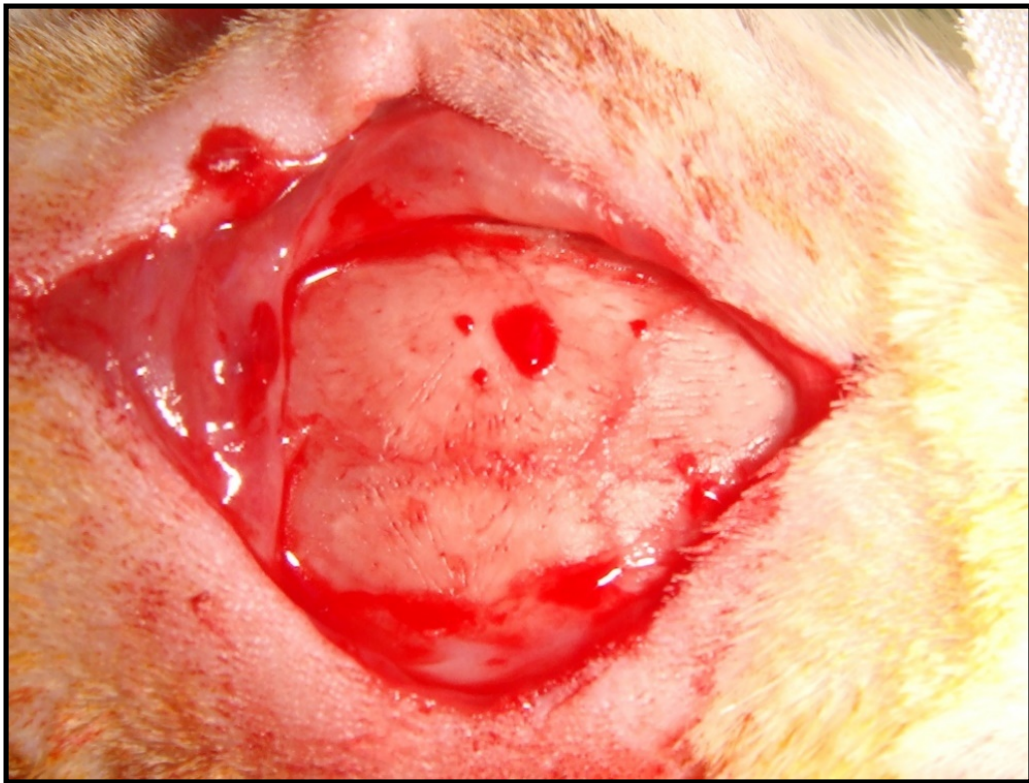


FIGURA 38. Incisión de abordaje con exposición y disección subperióstica de ambos parietales. La flecha señala la sutura sagital interparietal.

A continuación se realizaba un orificio de 5 mm de diámetro en el hueso parietal izquierdo. Para ello se utilizó de inicio una trefina de dientes en sierra de carburo de tungsteno. Cuando estaba próximo a completar el corte se cambiaba a una trefina diamantada de 5 mm de diámetro externo (*Mozo Grau SL, Valladolid, España*), conectada a una pieza de mano dental a 300 revoluciones por minuto con irrigación continua con suero fisiológico, que permitía completar el corte, llegando hasta la duramadre pero sin rasgarla (**Figura 39**)

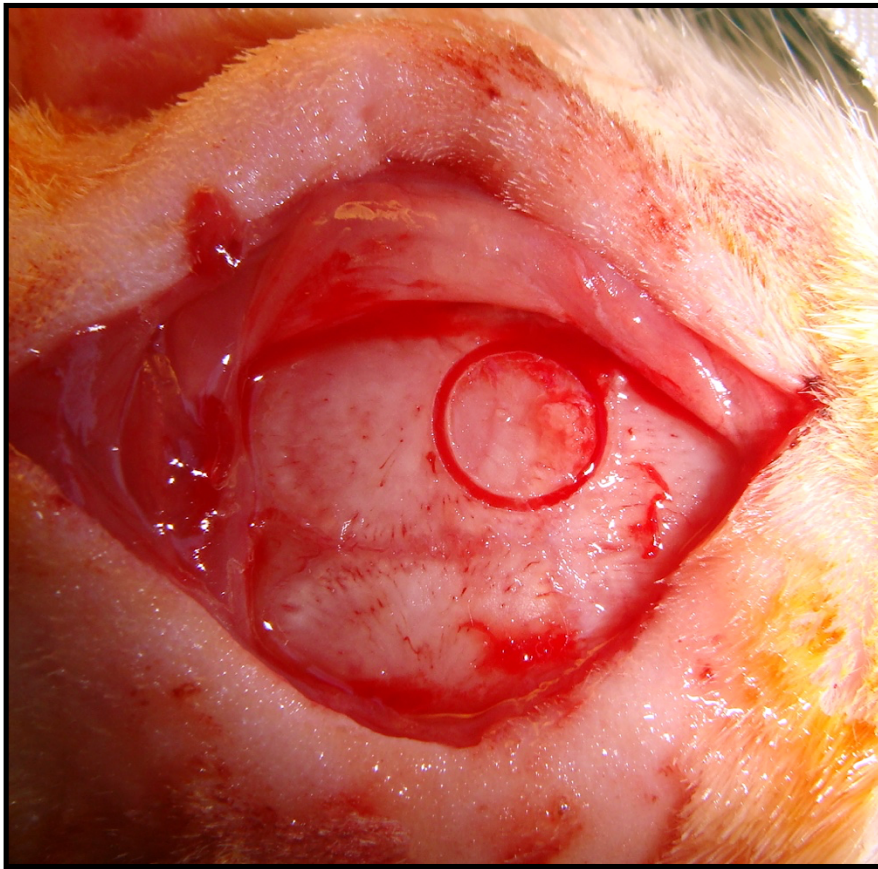


FIGURA 39. Craneotomía realizada y completada, con preservación de la duramadre.

Con ayuda de un excavador dental se levantaba el disco óseo y se irrigaba el lecho quirúrgico con abundante suero fisiológico para retirar los restos óseos y de coágulos (**Figuras 40 y 41**). La integridad de la duramadre (**Figura 42**) se comprobaba visualmente y por la ausencia de drenaje de líquido cefalorraquídeo (**Figura 43**).

El defecto óseo resultante se rellenaba según el grupo asignado al animal (**Figuras 41 y 42**) (véase apartado 2.3 del Material y Método), e inmediatamente se cerraban el periostio y la piel como planos separados con puntos sueltos de polyglactin 910 de 6/0.

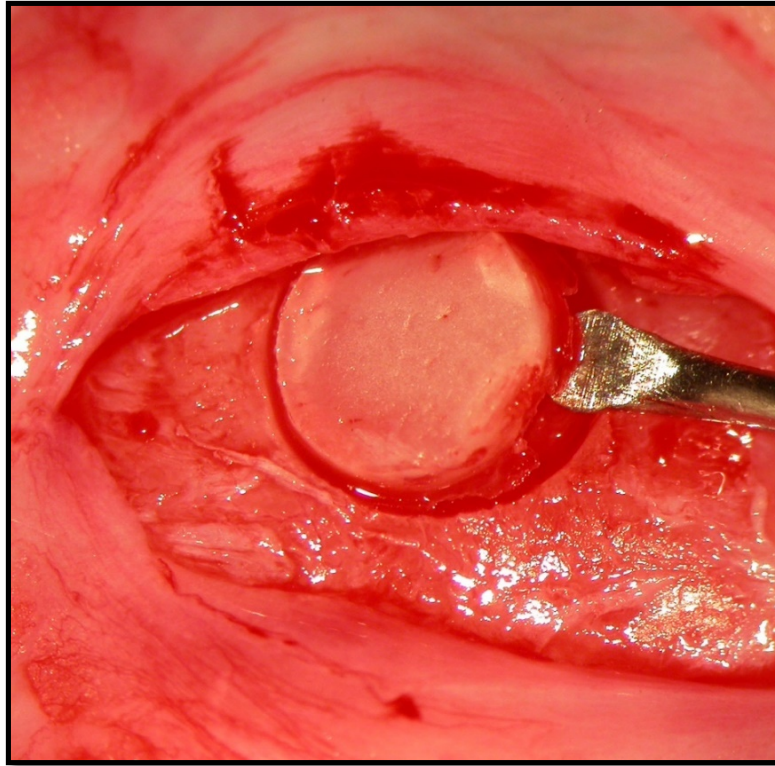


FIGURA 40. Completada la craneotomía, se procede a retirar el disco óseo con ayuda de un excavador dental.



FIGURA 41. Fragmento de la craniectomía donde se aprecia la uniformidad de los bordes de la osteotomía.

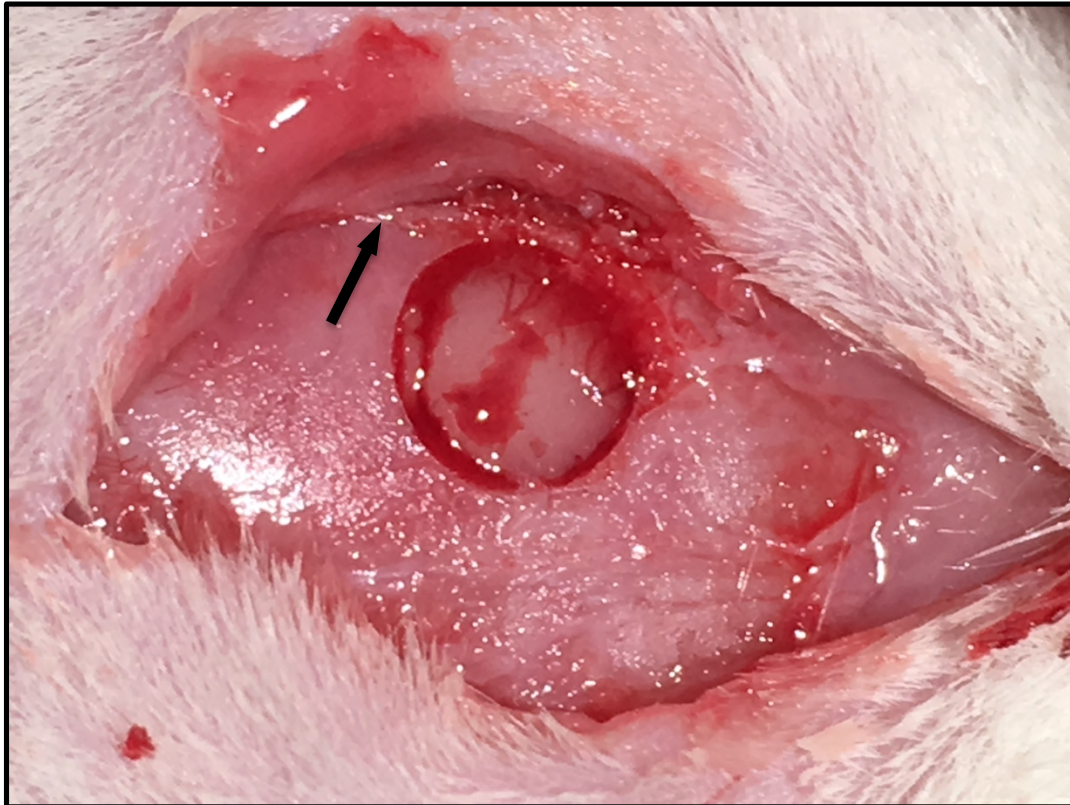


FIGURA 42. Una vez retirado el disco, se comprueba la integridad de la duramadre. La flecha negra señala la unión del temporal con el parietal izquierdo.

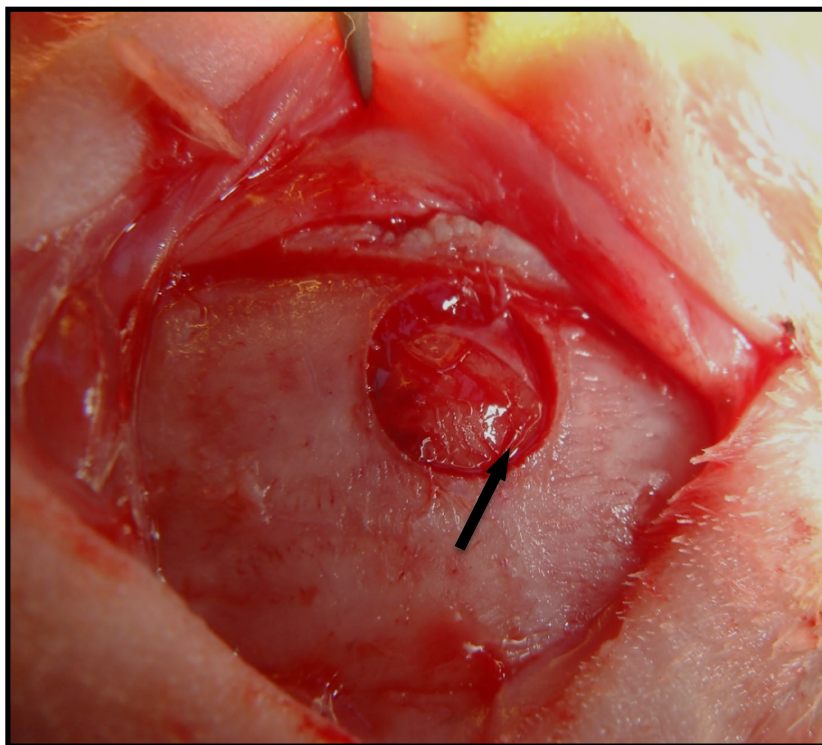


FIGURA 43. La Flecha negra indica desgarró de la duramadre con herniación cerebral. Ésta era indicación para descartar el animal.



FIGURA 44. A: DBX-Putty® en su formato original, listo para ser aplicado. B: DBX añadido al defecto. Nótese la escasa consistencia del material y su tendencia a disgregarse.

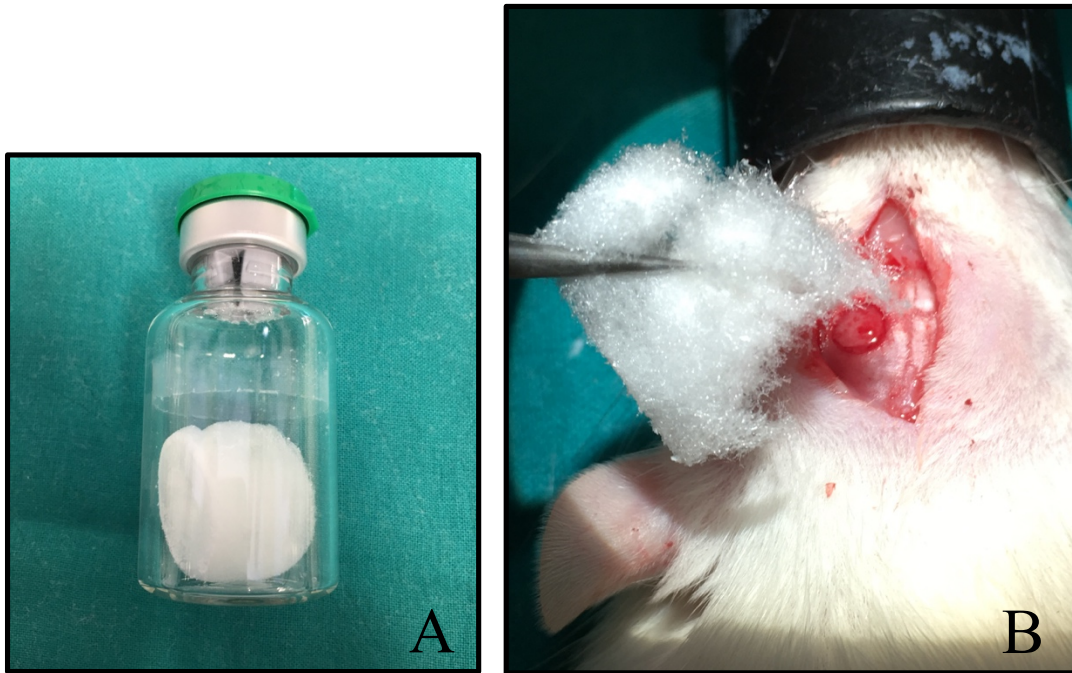


FIGURA 45. Colloss-E® en su presentación comercial original (A) dispuesto a ser aplicado al orificio de la craneotomía (B). Nótese su apariencia algodonosa y tendencia a adherirse al instrumental.



FIGURA 46. Colloss E® aplicado en la creaneotomía.



FIGURA 47. Colloss E® instantes después de ser aplicado en la creaneotomía. Obsérvese el elevado grado de compactación que se puede producir en el biomaterial.



FIGURA 48. Defecto óseo resultante relleno con partículas de Bio-Oss®.

Al comienzo de la intervención se administraba cefazolina intramuscular (0'3 mg/kg) como profilaxis antibiótica preoperatoria y analgesia intra y postoperatoria con buprenorfina intraperitoneal (0.5mg/kg). El personal auxiliar del animalario se encargaba del control postoperatorio tardío.

2.5 SACRIFICIO DEL ANIMAL

Como criterios de punto final se establecieron: infección local de la herida, dehiscencia de la sutura o cualquier alteración sistémica evidente del animal. En ningún caso fue preciso sacrificar animal alguno de forma anticipada.

El sacrificio programado de los animales se realizó a las 12 semanas de la intervención, mediante decapitación por guillotina, previa anestesia del animal en cámara de inducción anestésica inhalatoria. Las piezas decapitadas se conservaron en hielo seco, adecuadamente envueltas, para su análisis radiológico, en un plazo máximo de 4 horas. Una vez realizado el escaneado en ICAT de la piezas se procesaron tal y como se describe en el siguiente apartado.

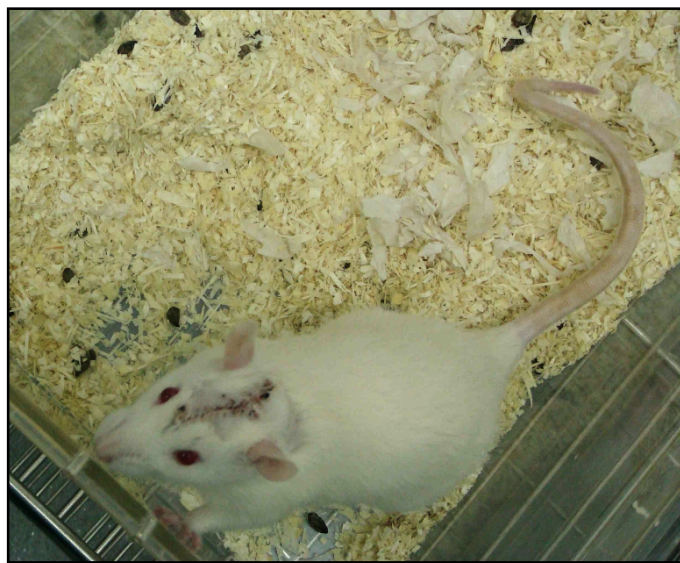


FIGURA 49. Imagen del animal intervenido en el postoperatorio inmediato (24h) donde se aprecia la ausencia de signos inflamatorios locales o signos de dolor por parte del animal.

2.6 TÉCNICAS HISTOLÓGICAS

2.6.1 Preparación del bloque de tejido

Una vez separada la cabeza del tronco, la piel craneal de cada animal fue separada del esqueleto con tijeras de Metzembaum, prestando atención para mantener el periostio unido al hueso craneal. Con unas tijeras de Mayo introducidas por el foramen magno, ambos huesos temporales fueron seccionados en sentido posteroanterior. La unión de los huesos nasales con los huesos frontales fue fracturada manualmente en tallo verde, y completada con tijeras. Se obtuvo así un bloque de tejido de cada animal que incluía ambos huesos frontales, ambos huesos parietales con los defectos óseos, el periostio y la duramadre.

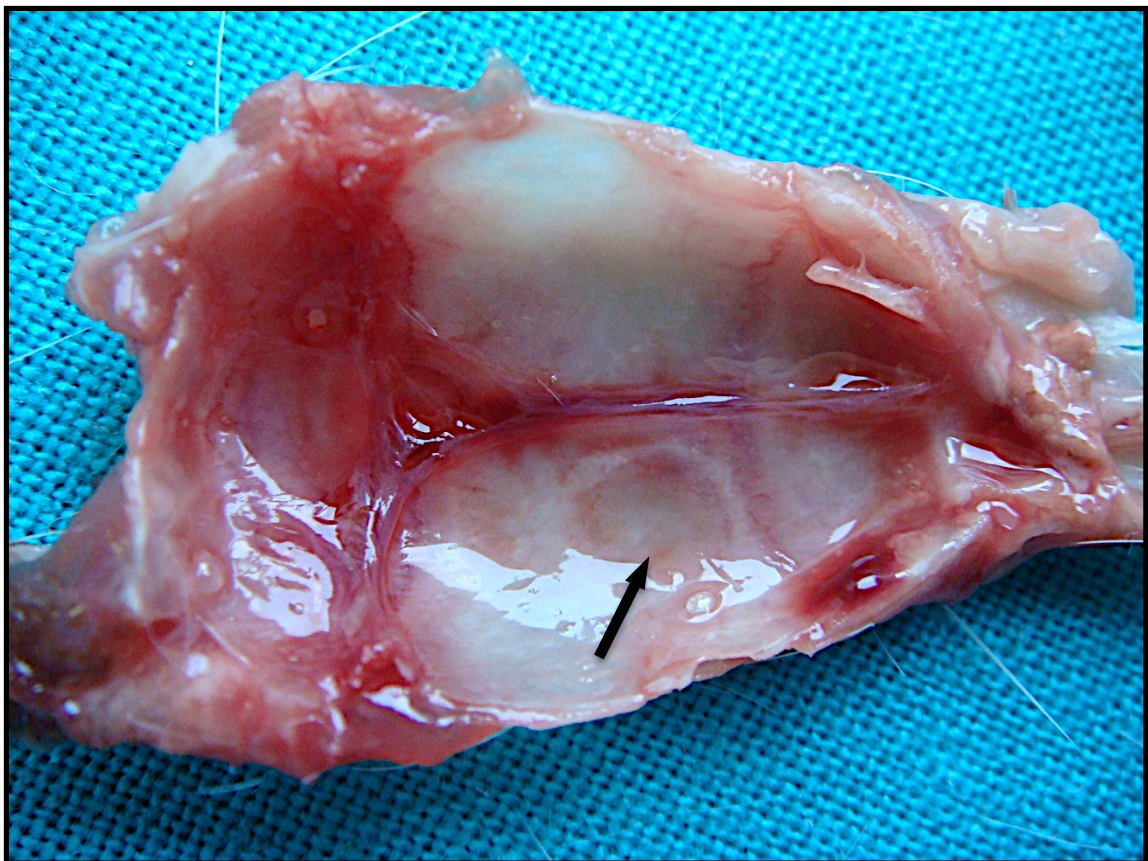


FIGURA 50. Pieza anatómica obtenida a partir de la técnica descrita en el apartado 2.6.1. La flecha señala la localización del defecto completamente regenerado en extensión, pero de menor grosor que el parietal contralateral.

2.6.2 Fijación y descalcificación

Cada bloque de tejido fue fijado por inmersión en formol, durante 3 a 5 días. Posteriormente se descalcificó por inmersión en solución de ácido nítrico durante 48 horas.

2.6.3 Tallado y preparación de los bloques de parafina

Se seccionó cada pieza en dos mitades, una anterior y otra posterior, mediante un corte realizado por el centro de la craneotomía con una hoja de bisturí con hoja del nº 20. El contorno de la misma era evidente en todos los casos, a veces directamente y siempre al colocar la pieza al trasluz, por lo que se pudieron efectuar los cortes con considerable precisión. Se recortó cada mitad hasta obtener piezas rectangulares que incluyeran un borde de hueso craneal nativo alrededor de la craneotomía. Cada pieza rectangular incluyó un saliente de hueso que sirvió como referencia para mantener la orientación de la pieza. La pieza resultante del tallado fue deshidratada con soluciones de alcohol progresivamente más concentradas. Cada bloque de hueso craneal fue colocado verticalmente en un paramol de 10 mm de profundidad. Se eligió la orientación de cada bloque para que la mitad anterior fuera seccionada en un plano coronal, y para que la mitad posterior fuera seccionada en planos parasagitales. Tanto en el grupo observacional como en los grupos experimentales cada paramol fue rellenado con parafina caliente, y sobre ésta se colocó un cassette estándar. Todo ello se dejó enfriar a 5°C durante 24 horas. Posteriormente el paramol fue desprendido, y cada bloque de parafina quedó listo para ser seccionado.

2.6.4 Cortes seriados

Cada bloque en parafina fue seccionado seriadamente en su totalidad. Para ello se hicieron cortes sucesivos de 5 micras de espesor con un microtomo semiautomático de precisión. Cada 30-50 cortes, el bloque de parafina era refrigerado en hielo, para limitar el efecto de dilatación por calentamiento. Las secciones coronales y las secciones parasagitales fueron procesadas del siguiente modo.

- *Secciones coronales.* De los bloques de parafina en los que estaban incluidas las mitades anteriores de las craniectomías (y que iban a resultar en secciones coronales del cráneo) se obtuvieron unos 600 cortes. Se recogían para procesamiento ulterior 2 secciones consecutivas cada 60 cortes (2 secciones cada 300 micras). El resto de cortes fue desechado.
- *Secciones parasagitales.* De los bloques de parafina en los que estaban incluidas las mitades posteriores de las craniectomías (y que iban a resultar en secciones parasagitales del cráneo) se obtuvieron unos 1200 cortes. Se recogieron para su procesamiento 2 cortes consecutivos cada 120 cortes (2 secciones cada 600 micras). El resto de cortes fue desechado.

2.6.5 Tinciones

Los cortes histológicos así seleccionados fueron montados en portaobjetos numerados y codificados. Se tiñó cada par de cortes consecutivos, uno con hematoxilina-eosina, y el otro con tricrómico de Masson. La tinción de Hematoxilina-eosina tiñe permite una adecuada diferenciación de las estructuras tisulares. La tinción con tricrómico de Masson tiñe con tonos verdes el hueso mineralizado maduro y con tonos rojizos el hueso inmaduro y el osteoide.

2.6.6. Análisis Histológico

Para las observaciones histológicas se utilizó el microscopio óptico con un rango de aumentos entre 20 y 400.

En el **Grupo Control** se efectuó una descripción cualitativa de las características del defecto óseo con especial énfasis en la intensidad de la regeneración ósea, su origen (desde los bordes del defecto o a partir del periostio, duramadre o de yemas vasculares) y su morfología. También se describió la respuesta del periostio y de la duramadre y el comportamiento del hueso de los bordes del defecto. Asimismo, se determinó la posibilidad de identificación de los bordes del defecto original. Finalmente se evaluó la existencia o no de continuidad ósea entre los bordes del defecto inicial. En los **Grupos experimentales** se efectuó una descripción cualitativa similar al grupo control. Además, se enfatizó la búsqueda de reacciones inflamatorias ante la implantación de los materiales de investigación, como la presencia de células inflamatorias agudas y crónicas y los granulomas de cuerpo extraño.

2.6.7 Estimación de volúmenes por el método de Cavalieri

Para el estudio estereológico se utilizaron las series de cortes histológicos teñidos con tricrómico de Masson, puesto que desde el principio se comprobó que resultaba más sencilla la identificación de los bordes del defecto y del hueso regenerado con esta tinción que con la de hematoxilina-eosina.

Se colocó cada una de las secciones histológicas en un proyector-lupa de mesa, que proporcionaba una ampliación de 25 aumentos. Superpuesta a la imagen proyectada, se colocó una rejilla cuadrículada de puntos con 5 milímetros de distancia entre puntos, orientada al azar, y se contaron por separado los puntos de la retícula (impactos) que coincidían con hueso regenerado.

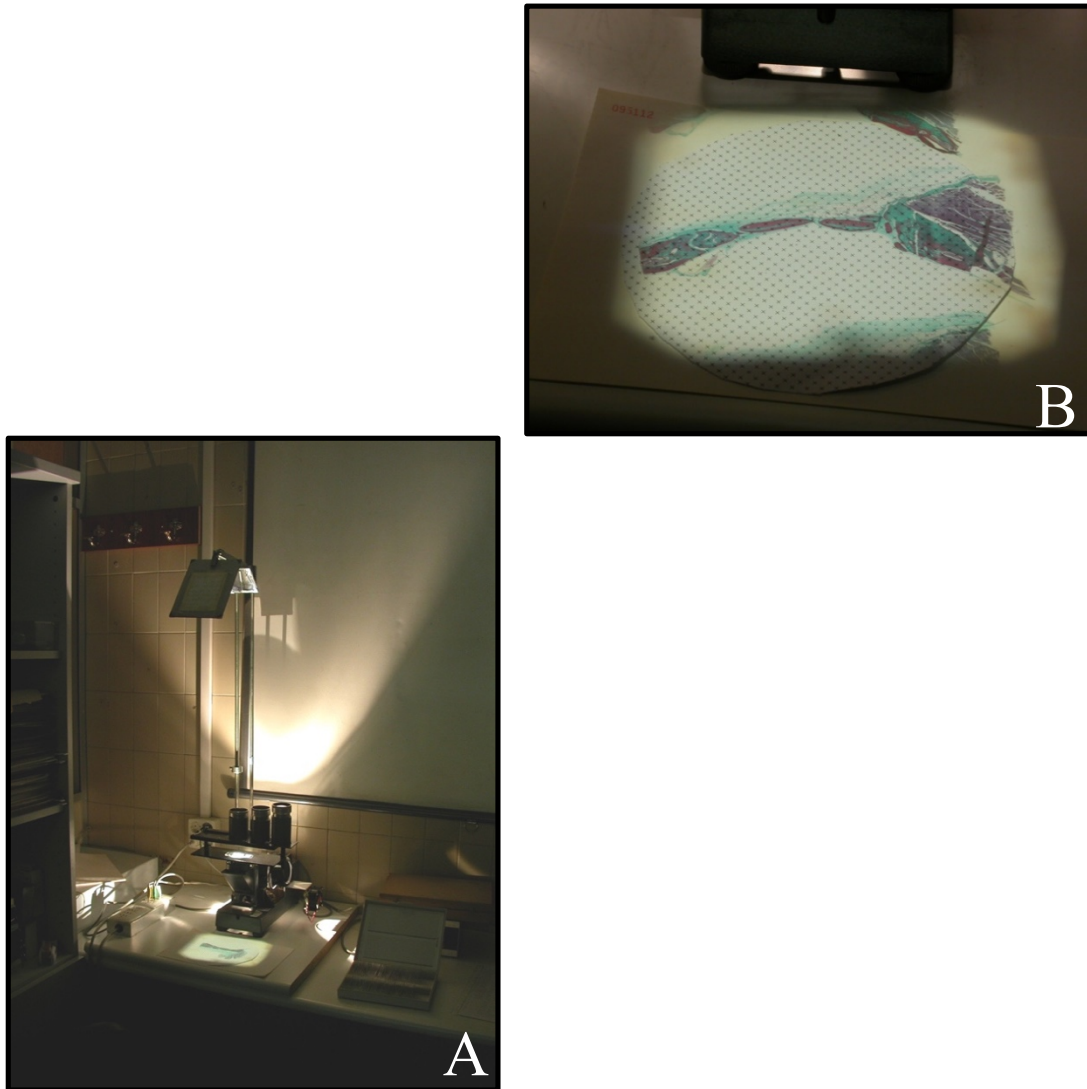


FIGURA 51. Proyector de mesa para imágenes histológicas (A). A la derecha apreciamos a mayor aumento la proyección de la imagen sobre la retícula de puntos (B).

2.6.7.1 Criterios para los impactos:

- ***Impactos en el hueso regenerado.*** Se consideró impacto todo punto de la retícula que se superponía con tejido teñido como hueso u osteoide en el interior de los límites mediolaterales o anteroposteriores del defecto óseo original.

- **Impactos en el Bio-Oss.** Debido al proceso de descalcificación y contracción por el procesamiento de las muestras, y a que el Bio-Oss está compuesto casi exclusivamente por matriz mineral desorganificada, se apreció en la mayoría de las secciones una contracción del material, con presencia de artefactos histológicos de vacío entre el Bio-Oss y el tejido de alrededor. Tanto los puntos de la retícula que se superponían con las partículas de Bio-Oss como los puntos que lo hacían sobre los espacios vacíos artefactuales se consideraron impactos.

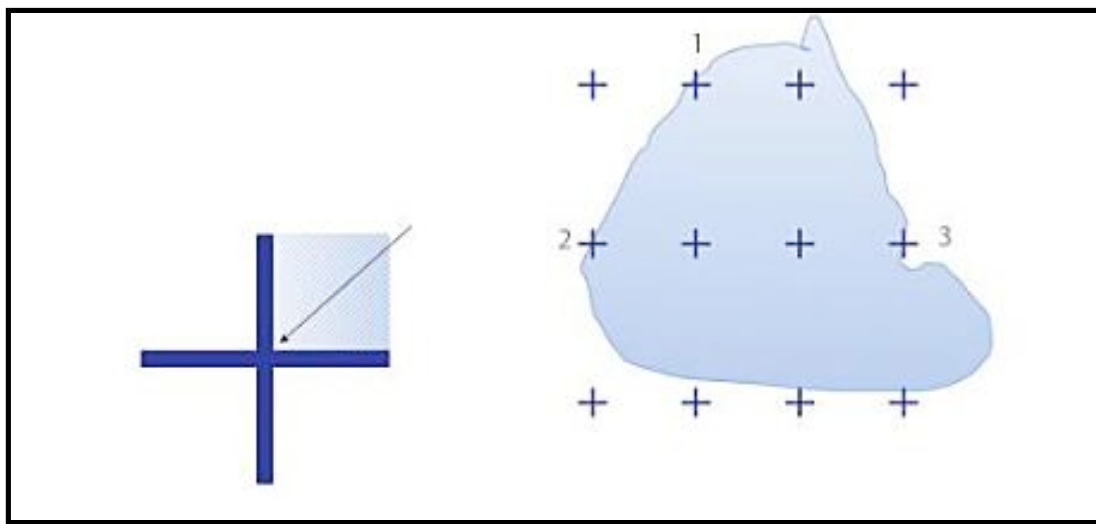


FIGURA 52. Criterios de inclusión para los puntos de un retículo: si el cuadrante superior derecho de la cruz asociada al punto (marcado por la flecha en el esquema) cae dentro del perfil, se cuenta el punto. Por ejemplo, los puntos 1 y 2 de la figura se incluyen; sin embargo, el punto 3 no se incluye.

2.6.7.2 Estimación del volumen de los compartimentos de interés (Hueso regenerado)

El cálculo de los volúmenes se efectuó en dos partes: por un lado se estimó el volumen de los compartimentos del hemidefecto anterior (muestreado con cortes coroneales), y por otro lado se estimó el volumen de los compartimentos del hemidefecto posterior (muestreado con cortes parasagittales)

Para cada defecto óseo se contaron todos los impactos (P) de todas de las preparaciones histológicas, tanto coroneales ($P_{(c)}$) como parasagitales ($P_{(s)}$) teñidas con tricrómico de Masson. Por un lado se sumaron los impactos en las m secciones coroneales (mc) $\left(\sum_{i=1}^{mc} P_{(c)} \right)$ del hemidefecto anterior. Por otro lado se sumaron los impactos en las m' secciones parasagitales (mps) $\left(\sum_{i=1}^{mps} P_{(ps)} \right)$ del hemidefecto posterior.

La distancia u entre cada punto de la rejilla se calculó directamente a partir de la magnificación obtenida con el proyector-lupa, y resultó ser de 0,2 mm. La distancia h entre dos secciones consecutivas era de 300 μm en la serie de secciones coroneales y de 600 μm en la serie de preparaciones parasagitales.

Conociendo la fórmula general del cálculo de volumen de un objeto por el método de Cavalieri (**Ecuación 5**):

$$V_{(objeto)} = u^2 \cdot h \cdot \sum P$$

El volumen de cada compartimento en el hemidefecto anterior se obtuvo mediante la siguiente fórmula expresada en mm^3 :

$$V_{(c)} = 0'2^2 \cdot 0'3 \cdot \sum_{i=1}^{mc} P_{(c)}$$

Análogamente, el volumen de cada compartimento en el hemidefecto posterior se obtuvo mediante la siguiente fórmula, igualmente expresada en mm^3 :

$$V_{(ps)} = 0'2^2 \cdot 0'6 \cdot \sum_{i=1}^{mps} P_{(ps)}$$

El volumen de cada compartimento en cada animal se obtuvo sumando los volúmenes de cada hemidefecto, mediante la siguiente fórmula:

$$V_{(a)} = V_{(c)} + V_{(ps)}$$

Por tanto, se estimó el volumen de hueso regenerado en todos los defectos óseos, y el volumen de Bio-Oss remanente en los defectos óseos del grupo Bio-Oss.

2.7 TÉCNICAS RADIOLÓGICAS

Previo a su procesamiento histológico la totalidad de muestras obtenidas tras decapitación fueron escaneadas en grupos de cinco muestras en el Centro ICAT Madrid mediante el sistema ICAT de Tomografía de Haz Cónico ó CBCT, cuyos principios físicos de funcionamiento ya han sido descritos en apartados anteriores.



FIGURA 53. Sistema ICAT de tomografía de haz cónico. Imagen correspondiente a las instalaciones del Centro ICAT sito en C/Nuñez de Balboa, Madrid, España.

2.7.1 Especificaciones Técnicas del Sistema ICAT de CBCT

- Fuente de rayos-X: Alta frecuencia, Potencial Constante, ánodo fijo 120 kVp, 3-8mA (Modo Pulsátil)
- Haz de rayos-X: Cónico
- Punto Focal: 0.5 mm
- Detector de Imagen: Panel Plano de Silicona Amorfa de 20x25 cm
- Escala de Grises: 14 bit
- Tamaño de Voxel: 0.4 mm (estándar), 0.2 mm (mínimo)
- Adquisición de imagen: Rotación única de 360°
- Tiempo de Escaneo: Estándar de 20 seg. En posición: 10, 20 ó 40 seg.
- Dimensiones del escáner: 16 cm/diámetro) x 13 cm (altura)
- Reconstrucción Primaria: 1 minuto para escáner estándar de 20 seg.

En nuestro diseño experimental todos los escáneres se realizaron ajustando el FOV al máximo a la muestra, con protocolos de alta resolución (0.2 mm de voxel) y máximo tiempo de escaneado (40 seg).

Las muestras se colocaron sobre un soporte prefijado para poder restringir al máximo el FOV sobre la muestra y así obtener mayor resolución. Inicialmente se procedió al escaneado de cada muestra individualmente. Tras realizar diversas pruebas se comprobó que el escaneado de múltiples muestras hasta un máximo de 5 era factible, con el consiguiente ahorro de tiempo y dinero.



FIGURA 54. Disposición de los especímenes a examinar sobre una caja de cartón con el fin de facilitar el escaneado. Debido a las características de escaneado, fue posible realizar el estudio simultáneo de hasta 5 piezas.

2.7.2. Análisis y Procesado de los Datos Radiológicos.

Los datos obtenidos fueron registrados en soportes de disco duro portátiles por duplicado en formato DICOM y posteriormente fueron analizados mediante Software OsiriX® v 8.0.2 en versión freeware de 32 bits para análisis de imágenes en formato DICOM.

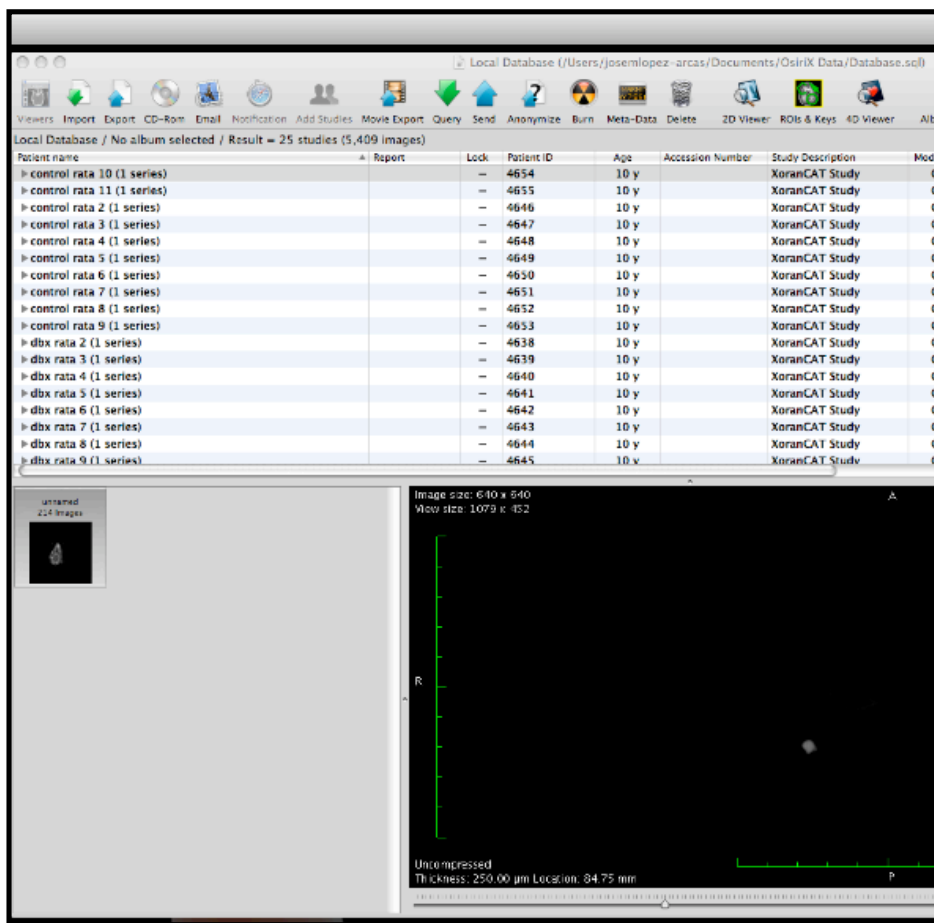


FIGURA 55. Base de Datos del programa Osirix® con la totalidad de animales escaneados y listo para su estudio y análisis.

Se realizaron reconstrucciones renderizadas de superficie en 3D y reconstrucciones 3D-MPR ortogonales para determinar simultáneamente la zona intervenida. Se determinó que el grosor medio de los parietales en diferentes posiciones de las piezas examinadas oscilaba entre 0,77 y 0,81 mm. Se decidió aceptar un espesor medio del hueso parietal de 0,8 mm. Gracias a ello, pudimos determinar que el volumen inicial del defecto podría asemejarse al de un cilindro de 5 mm de Diámetro por 0,8 mm de altura. A partir de ello, se calculó que el volumen estándar de los defectos de las craneotomías era de 15,7 mm³.

Se utilizó la herramienta CLUT-Flow para sustituir la escala de grises habitual por una escala de color, pudiendo así señalar de una forma más ilustrativa los cambios en la densidad radiológica en las distintas áreas. En cada uno de los planos de las secuencias 3D-MPR, se determinó una ROI (*Region of Interest*) que correspondía con los límites de la craniectomía realizada. Sobre ella se delimitaron, utilizando la herramienta de polígono cerrado, diferentes ROIs sobre las zonas sin regenerar. Posteriormente se procedió a calcular el Volumen de dichos ROIs, integrados en una sola estructura, pudiendo calcular igualmente la Densidad media radiológica (medida en unidades Hounsfield, aunque con la salvedad de la validez de dichos datos, tal y como se comentó en la Introducción) de dicho objeto. Calculado el volumen del ROI no regenerado se extrapolaba posteriormente el volumen óseo verdaderamente regenerado.

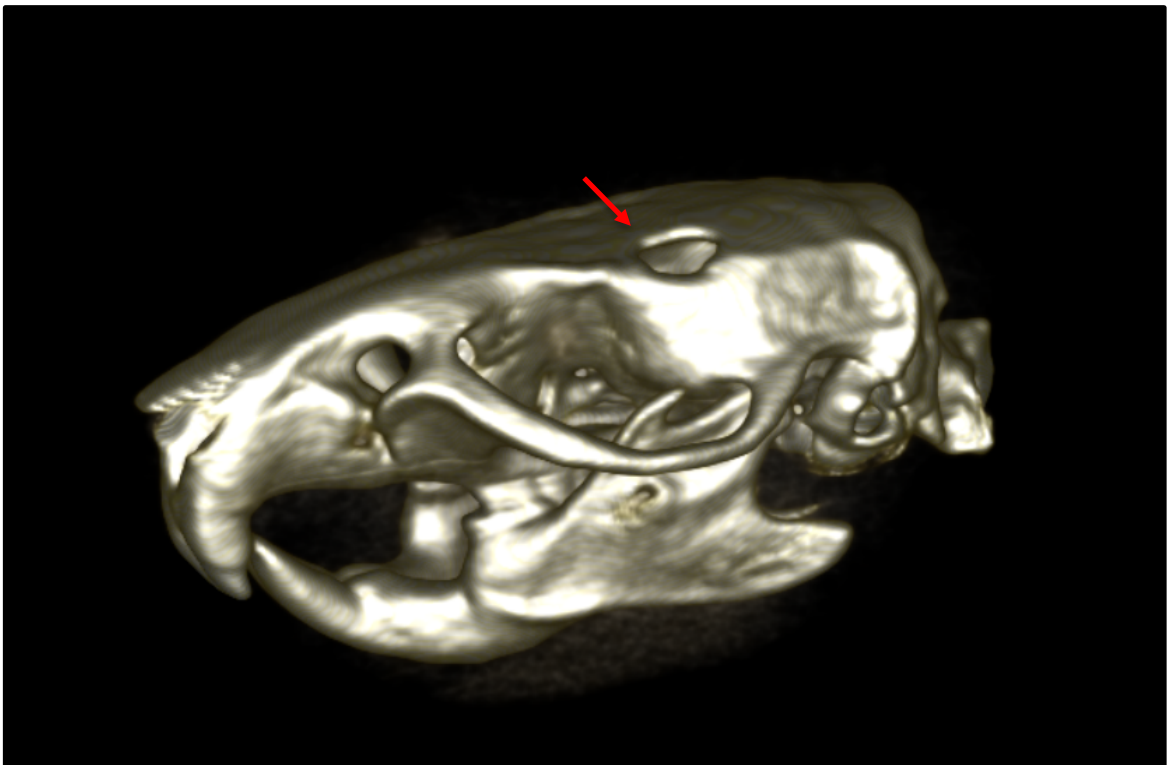


FIGURA 56. Renderizado 3D del ID: CONTROL 1 donde se identifica una regeneración incompleta del defecto inicial (Flecha)

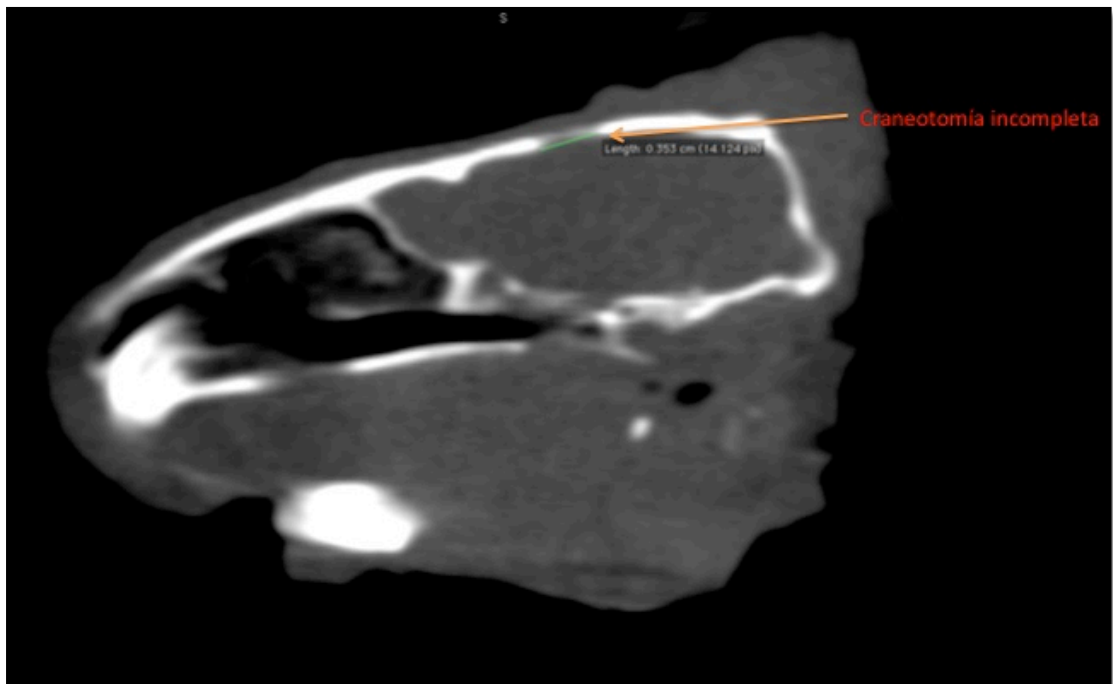


FIGURA 57. Reconstrucción 2D en un corte sagital donde claramente se identifican los límites de la craneotomía.

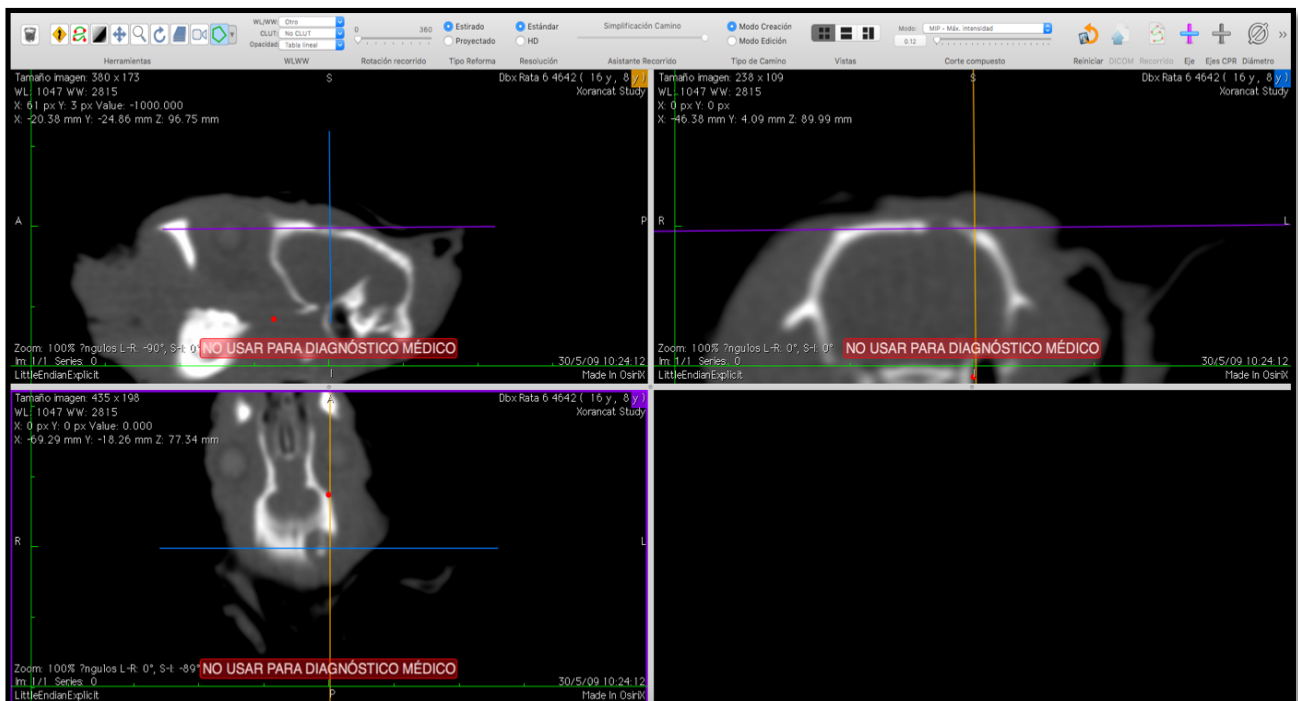


FIGURA 58. Captura de pantalla donde se aprecia la utilización de la herramienta 3D-MPR para la correcta identificación simultáneamente del defecto en los tres planos del espacio.

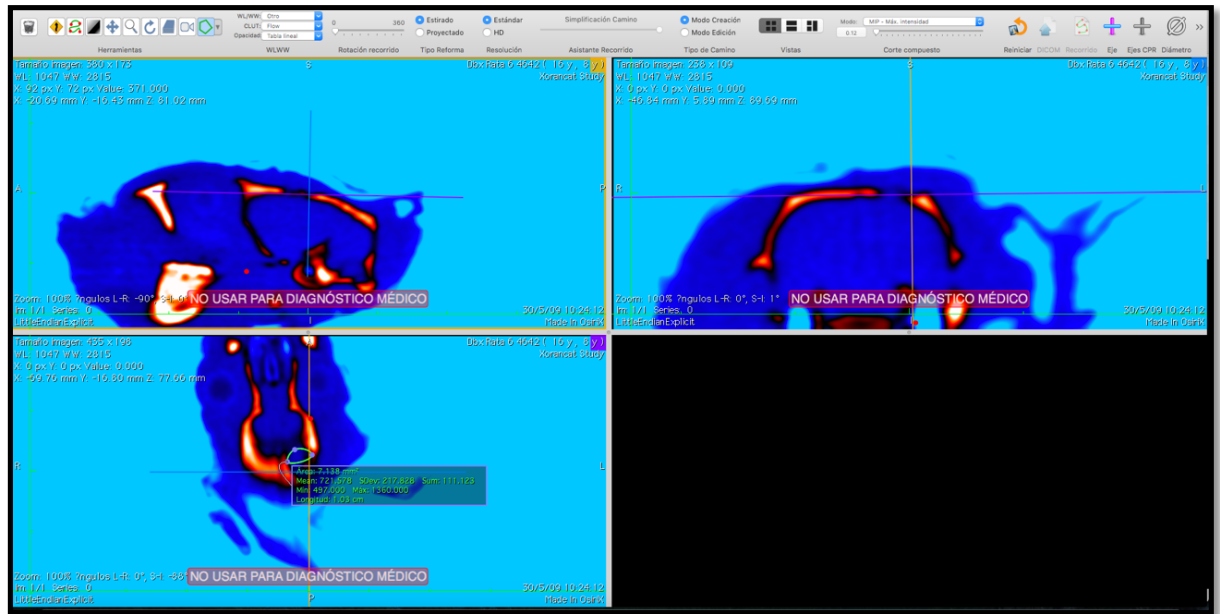


FIGURA 59. Aplicación del filtro CLUT-Flow para analizar la gradación de densidades óseas en y próximas al defecto óseo.

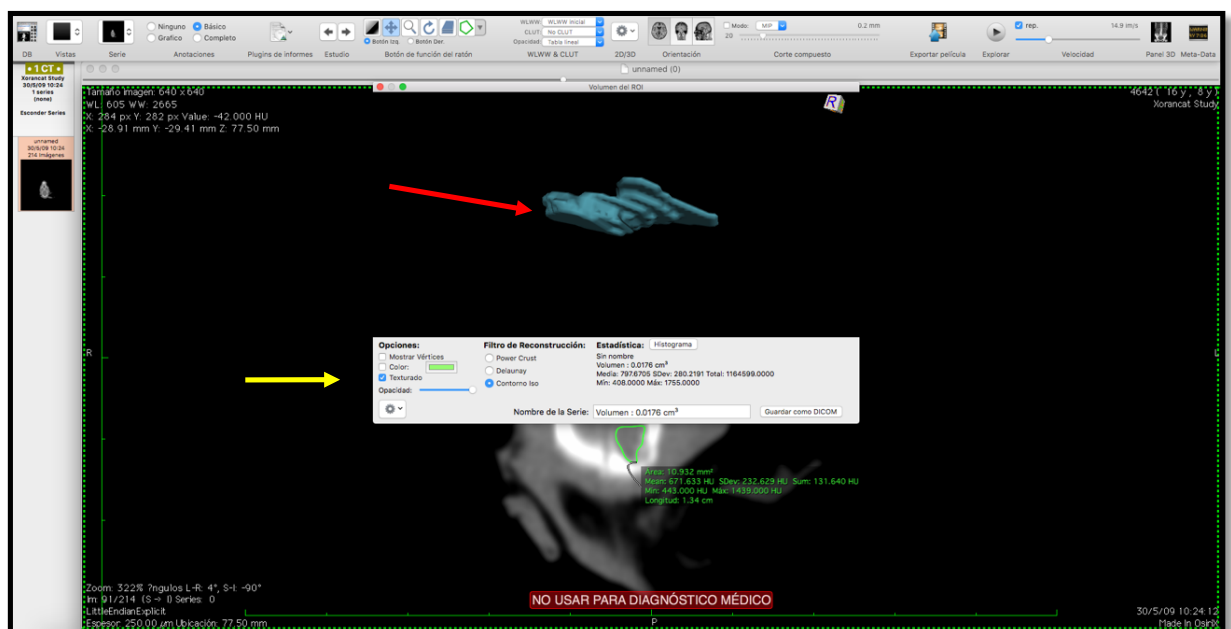


FIGURA 60. Cálculo del ROI correspondiente a la zona del defecto no regenerada. La Flecha Roja señala la reconstrucción volumétrica de la zona regenerada. La flecha Amarilla marca el cuadro diálogo en el que se muestra el volumen de dicho defecto así como la densidad media del mismo.

2.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos obtenidos a partir del análisis esterológico y radiológico de los especímenes fueron recogido, archivados y estandarizados en una base de datos y posteriormente procesados con Software Estadístico SPSS 15.0 (IBM, Estados Unidos).

RESULTADOS

1.PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

1.1 GRUPO TÉCNICA QUIRÚRGICA

Tal y como comentamos en el apartado 2.3 de la sección de Materiales y Métodos, se emplearon un total de 15 animales para la puesta a punto de la técnica quirúrgica. De apariencia sencilla, la realidad mostró su enorme complejidad para cumplir los estándares de calidad prefijados (preservación de la integridad de la duramadre, orificio homogéneo en ambas corticales y ausencia de sangrado del seno dural).

En este sentido, la percepción del investigador fue que con las trefinas convencionales de carburo de tungsteno era muy difícil completar la craneotomía con la trefina por la longitud de los dientes de sierra de su parte activa sin desgarrar la duramadre. La consecuencia de ello era que la craneotomía se completaba en un 80-85% y posteriormente se fracturaba en tallo verde con un excavador dental. El inconveniente de esta maniobra, era que en ocasiones el margen de cortical interno que permanecía en el interior de la craniotomía era superior a $1/3$ de mm que se consideraba el límite superior de tolerancia. En estos casos, se procedía a intentar completar la craniotomía, retirando los excesos de hueso de la cortical interna con el siguiente retraso en el tiempo quirúrgico, aumento del riesgo de lesión de la duramadre y pérdida de uniformidad del defecto óseo, en algunos casos desechando el animal cuando no se cumplían los criterios mínimos.

Finalmente, se optó a partir del séptimo animal por utilizar una trefina diamantada del mismo diámetro. Así, se iniciaba la craneotomía con la turbina de carburo de tungsteno hasta completar un 70% aproximadamente de la misma, momento en que se procedía a completar la craneotomía con la trefina de diamante, que permitía completar el corte con mayor seguridad.

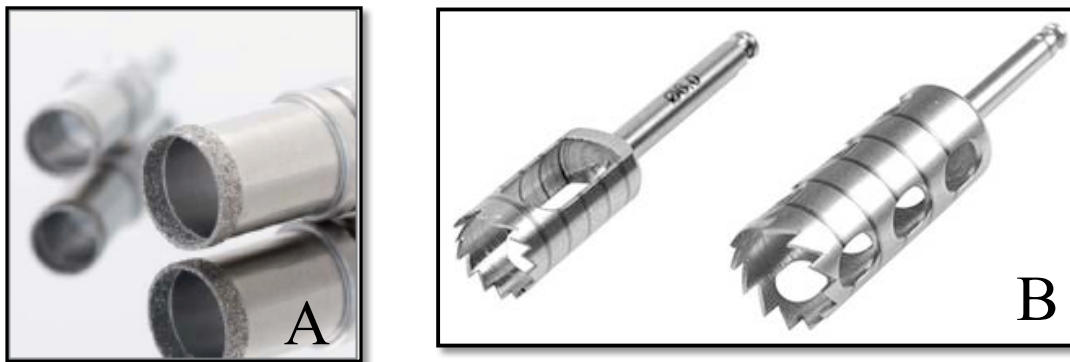


FIGURA 61. Vemos en estas imágenes la diferencia de la parte activa de una trefina diamantada (A) y una de carburo de tungsteno (B).

1.2 GRUPOS EXPERIMENTALES

La modificación de la técnica quirúrgica efectuada en el grupo de puesta a punto junto a la intervención de la totalidad de animales en un tiempo reducido (inferior a 10 días) permitió una gran fiabilidad en las craneotomías realizadas con la inclusión de la totalidad de animales intervenidos en los grupos experimentales.

En el postoperatorio, no se produjo ninguna circunstancia que motivase el sacrificio prematuro de ningún animal. Cabe destacar, no obstante la aparición en las ratas N° 5 y 6 del grupo control de una alopecia parcheada al segundo mes de estabulación. Ante la ausencia de signos clínicos que mostrasen infección de la craneotomía y dado que se trataba del grupo control en el que no se había introducido ningún material, se decidió continuar hasta completar los 3 meses establecidos.

Una vez sacrificados los animales 12 semanas después de la intervención quirúrgica, se procedió a la preparación de las muestras. El pelo había crecido alrededor de la cicatriz, que se apreciaba como una línea blanca inconspicua. El tejido en general tenía un aspecto normal, sin supuración, fistulización ni otros signos inflamatorios.

Previamente a la preparación de las muestras para la histología, se procedió al traslado de las cabezas decapitadas , conservadas en hielo seco para su escaneo en el CBCT del Centro ICAT tal y como se describe en el punto 2.7 del apartado de Materialy Método.

2. RESULTADOS TÉCNICAS RADIOLÓGICAS

2.1 ANÁLISIS RADIOLÓGICO CUALITATIVO

La totalidad de las piezas obtenidas tras decapitación de los animales experimentales pudieron ser sometidos al escaneo con CBCT en el centro ICAT sin incidencias. Tal y como se refleja en el apartado de Material y Método 2.7 , inicialmente se procedió al escaneo de cada pieza individualmente.

Tras realizar diversas pruebas se pudo comprobar que la resolución y fiabilidad del CBCT permitía el procesado de tres piezas simultáneamente. El único inconveniente de esta variante resultó que en el post-procesado era fundamental conservar la correcta identificación de cada pieza respecto a su posición en el sistema de escaneo.

Se obtuvieron de cada proceso , archivos de imágenes en formato DICOM que fueron almacenadas en dispositivo de almacenamiento portátil por duplicado.

Posteriormente se procedió al análisis de las imágenes según la secuencia expuesta en el apartado 2.7 de la sección de Material y Método. Aunque en ocasiones, con esta versión de software de 32 bits las reconstrucciones 3D tardaban algunos segundos en generarse, en general el manejo del mismo fue muy satisfactorio, permitiendo un completo análisis de las imágenes en 2D y 3D.

En términos generales, no hubo dificultad para identificar el orificio de la craneotomía en las reconstrucciones 3D. No obstante, en aquellos casos en los que se había producido una regeneración significativa, así como en el grupo Bio-Oss, era de utilidad completar la localización de dicho defecto con la herramienta 3D-MPR con filtro CLUT Flow para identificar con mayor precisión los límites del frente de regeneración.

Uno de los aspectos que evidenciamos al realizar el análisis radiológico es que, si bien las reconstrucciones 3D aportaban una información morfológica de la regeneración del defecto, tendían a sobreestimar el nivel de regeneración. Así, cuando se estudiaban los mismos especímenes con las herramientas 3D-MPR con filtro CLUT-Flow se evidenciaban gaps en el interior de la craneotomía que por el contrario, no eran evidentes en el 3D de superficie. Este dato, será comentado posteriormente en el apartado de Discusión.



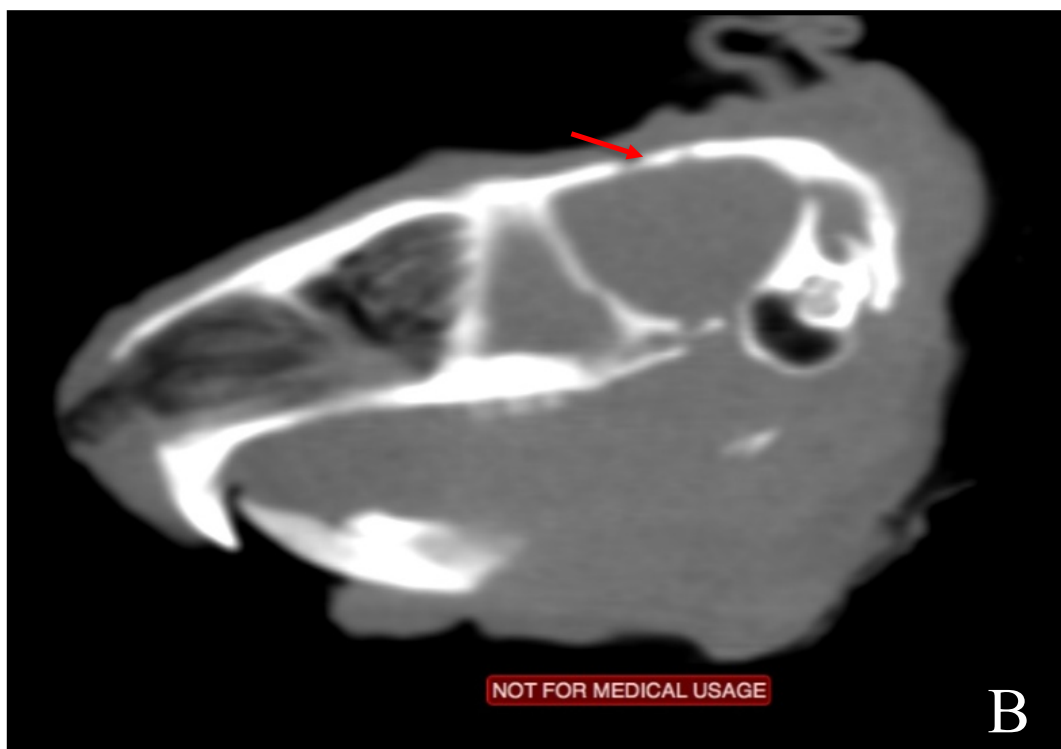


FIGURA 62. Comparativa de 3D (A) vs corte Sagital (B) en ID: Bio-Oss 4 en el que se aprecian diferencias por la menor resolución texturizada de la reconstrucción 3D.

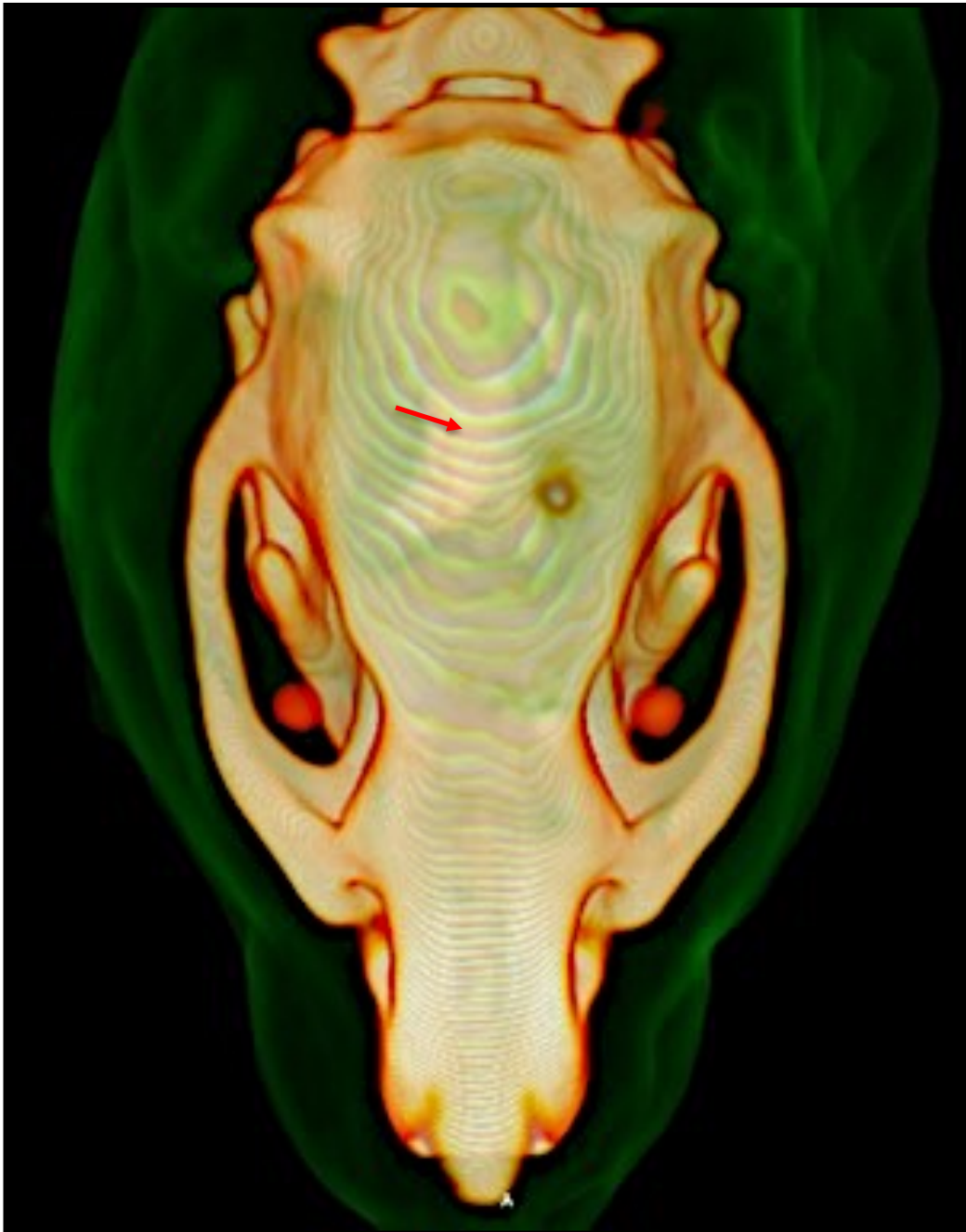


FIGURA 63. Reconstrucción 3D. ID: DBX 3. La Flecha señala la regeneración incompleta de la craniotomía.

En términos generales, la morfología de los defectos en las reconstrucciones 3D evidenciaba una mejor regeneración en el grupo de DBX, en contraposición con el grupo Control y Colloss. El grupo de Bio-Oss fue el grupo experimental en el que se constató una mejor morfología regenerativa de las craneotomías expresada en términos de mayor volumen óseo y mayor densidad radiológica. Como analizaremos posteriormente en el apartado de Discusión, estos datos eran esperables, como consecuencia de las características inherentes al Bio-Oss (esto es, su mineralización exponencialmente superior a DBX y Colloss) y deben ser tenidos en cuenta a la hora de interpretar los resultados obtenidos con el Análisis Estadístico.



FIGURA 64. ID: COLLOS 1 con puentado incompleto del defecto de la craneotomía.



FIGURA 65. ID: Bio-Oss 4. Se evidencia regeneración completa del defecto en 3D (A), Cortes Coronales (B) y Cortes Sagitales (C).



FIGURA 66. Reconstrucción 3D del ID: DBX 8. En el que se evidencia un puenteado completo del defecto. No obstante, la concavidad del defecto revela una regeneración incompleta del defecto en términos de grosor del hueso regenerado en comparación con el hueso adyacente.

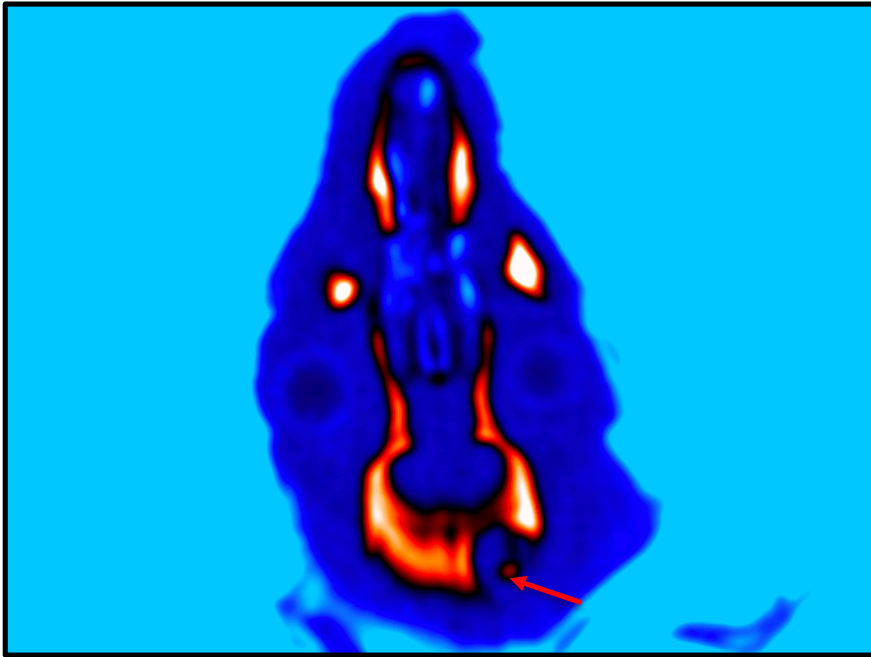


FIGURA 67. ID: DBX 6 en el que se aprecia, a pesar de una regeneración incompleta un islote central de hueso (Flecha).

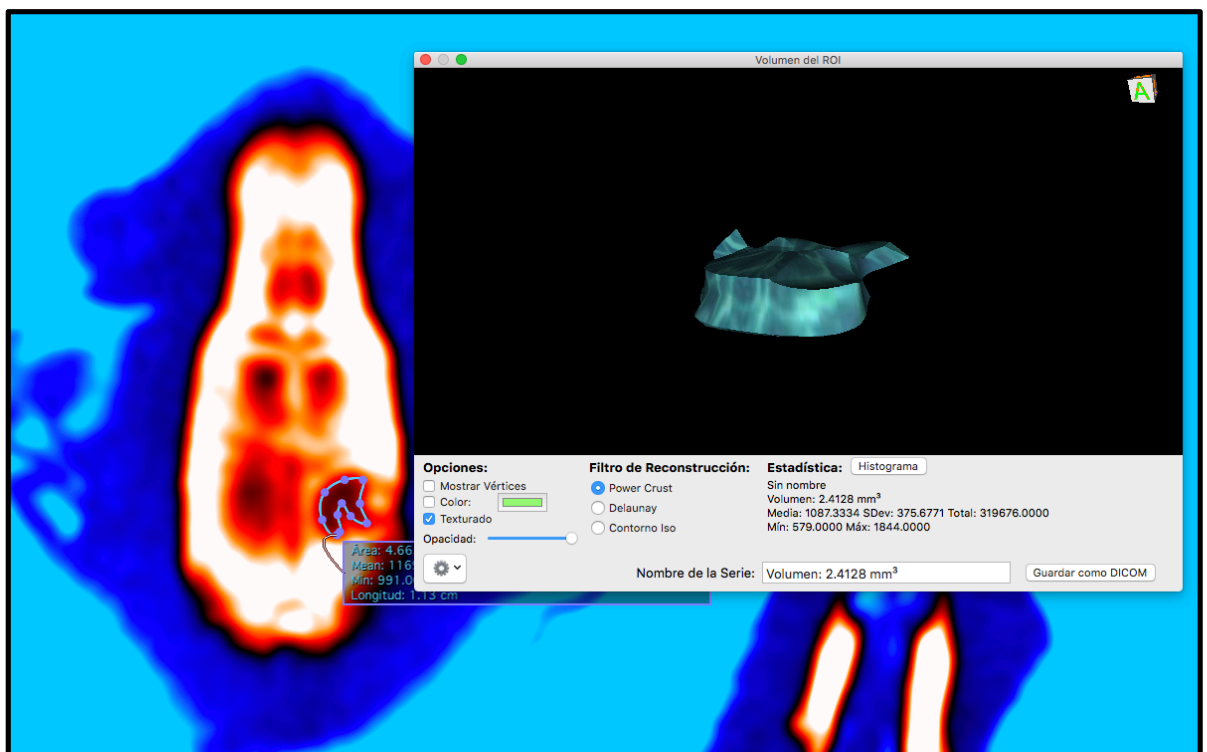


FIGURA 68. Cálculo del Volumen del ROI no regenerado en ID: Bio-Oss 2.

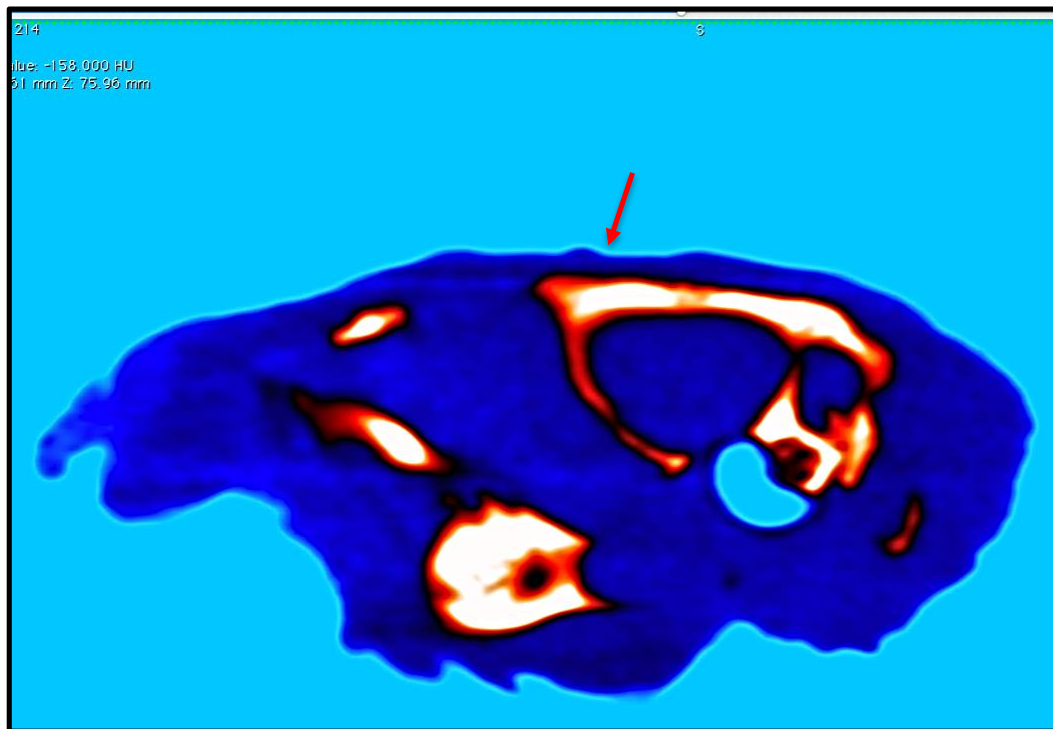


FIGURA 69. ID: DBX 2. Corte sagital con filtro CLUT en el que se aprecia puenteado completo del defecto con tejido óseo l con menor radiodensidad que el tejido adyacente, como corresponde al hueso inmaduro.

2.2 ANÁLISIS RADIOLOGICO CUANTITATIVO

En la TABLA 10 se recogen los datos obtenidos a partir del cálculo de los ROI.

TABLA 10. DATOS OBTENIDOS A PARTIR DEL ANÁLISIS RADIOLOGICO CON CBCT (ICAT)

ID ANIMAL	ESCANEADO	VOLÚMEN ÓSEO REGENERADO (mm3)	DENSIDAD ÓSEA (Unidades Hounsfield)
CONTROL 1	CORRECTO	5,430	754,23
CONTROL 2	CORRECTO	4,340	731,21
CONTROL 3	CORRECTO	3,760	698,12
CONTROL 4	CORRECTO	4,120	769,47
CONTROL 5	CORRECTO	3,456	687,91
CONTROL 6	CORRECTO	4,915	975,42
CONTROL 7	CORRECTO	4,240	782,93
CONTROL 8	CORRECTO	3,360	845,63
CONTROL 9	CORRECTO	3,860	912,65
CONTROL 10	CORRECTO	4,790	961,98

DBX 1	CORRECTO	8,056	1.045,21
DBX 2	CORRECTO	11,160	1.232,17
DBX 3	CORRECTO	6,464	942,78
DBX 4	CORRECTO	5,075	897,41
DBX 5	CORRECTO	6,973	796,03
DBX 6	CORRECTO	10,721	1.113,62
DBX 7	CORRECTO	3,613	761,29
DBX 8	CORRECTO	7,215	881,92
DBX 9	CORRECTO	9,870	1.067,32
DBX 10	CORRECTO	9,544	946,24
COLLOSS 1	CORRECTO	3,950	765,55
COLLOSS 2	CORRECTO	2,350	641,52
COLLOSS 3	CORRECTO	4,450	811,09
COLLOSS 4	CORRECTO	3,954	780,34
COLLOSS 5	CORRECTO	2,650	675,88
COLLOSS 6	CORRECTO	3,630	769,25
COLLOSS 7	CORRECTO	2,290	668,41
COLLOSS 8	CORRECTO	3,221	803,33
COLLOSS 9	CORRECTO	2,980	758,07
COLLOSS 10	CORRECTO	3,436	913,91
BIO-OSS 1	CORRECTO	10,231	1.202,33
BIO-OSS 2	CORRECTO	9,978	1.193,60
BIO-OSS 3	CORRECTO	8,412	973,54
BIO-OSS 4	CORRECTO	10,781	1.141,36
BIO-OSS 5	CORRECTO	8,274	999,78
BIO-OSS 6	CORRECTO	9,969	1.042,97
BIO-OSS 7	CORRECTO	7,215	976,51
BIO-OSS 8	CORRECTO	8,524	1.038,65
BIO-OSS 9	CORRECTO	7,973	1.142,76
BIO-OSS 10	CORRECTO	8,423	1.099,97

2.2.1. Estadística Descriptiva

A partir de los datos obtenidos y recogidos en la Tabla 10, se efectuó la estadística descriptiva de los grupos experimentales en relación con el Volumen Óseo Regenerado, determinado mediante análisis Radiológico con CBCT y que se expresa en la **Tabla 11** y visualmente en la **Figura 70**.

TABLA 11. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA VOLUMEN ÓSEO REGENERADO EN LOS GRUPOS EXPERIMENTALES, MEDIDO CON CBCT.

GRUPO		VOLUMEN ÓSEO REGENERADO (mm ³) (CBCT)
CONTROL	<i>N</i>	10
	<i>Media</i>	4,22710
	<i>Desv. típ.</i>	,663393
COLLOSS	<i>N</i>	10
	<i>Media</i>	3,29110
	<i>Desv. típ.</i>	,726717
BIO-OSS	<i>N</i>	10
	<i>Media</i>	8,97800
	<i>Desv. típ.</i>	1,166724
DBX	<i>N</i>	10
	<i>Media</i>	7,86910
	<i>Desv. típ.</i>	2,470576

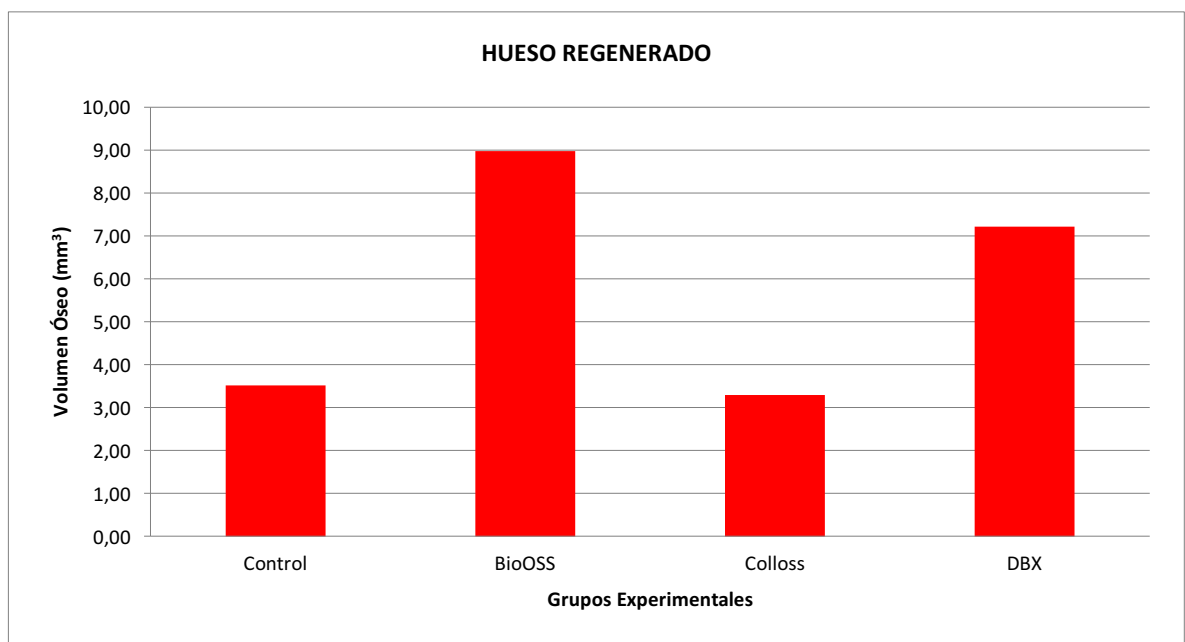


FIGURA 70. Volumen óseo regenerado en los grupos experimentales, medido con CBCT.

2.2.2. Comparación Volumen Óseo Regenerado Intergrupar (CBCT)

A partir de los datos obtenidos se trató de valorar si existían diferencias significativas entre los 4 grupos experimentales, para determinar si alguno de ellos tenía un potencial de regeneración superior al resto.

En primer lugar se analizó si los datos recogidos seguían o no una distribución normal. Para ello se aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Esta prueba evidenció que los datos de todos los grupos siguen una distribución normal. Por tanto, la prueba utilizada para hacer la comparación entre grupos fue un ANOVA para comparación de grupos de muestras independientes. El nivel de significación estadística para considerar una diferencia estadísticamente significativa fue del 0,05 ($p < 0.05$).

El ANOVA univariante evidenció que existen diferencias significativas ($p < 0,0001$) en esta variable debidas al GRUPO. Para realizar las comparaciones entre grupos se han utilizado las pruebas post hoc Tukey, Scheffé y Bonferroni. Según estas pruebas es el grupo DBX y Bio-Oss los que presentan diferencias significativas con el resto de grupos ($p < 0,05$). Serían estos grupos los que presenta un potencial de regeneración significativamente más alto que el resto de grupos. En el análisis detallado intergrupos podemos ver que:

- Hay diferencias significativas entre Control y tanto DBX como Bio-Oss, que son netamente superiores a Control pero no difieren entre si.
- Hay diferencias significativas entre Colloss y tanto DBX como Bio-Oss, que son superiores a Colloss pero no difieren entre si.
- Hay diferencia significativa entre Colloss y Control, $p=0.45$, siendo Colloss levemente superior a Control.

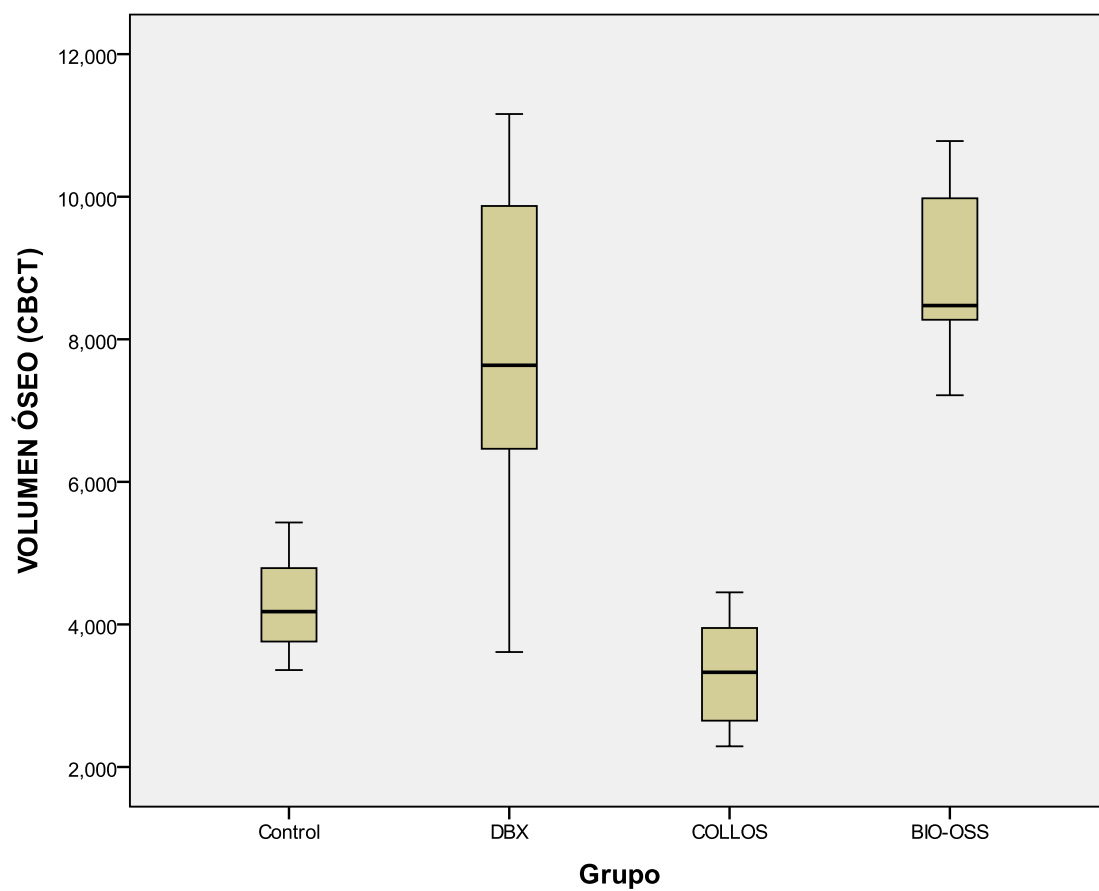


FIGURA 71. ANOVA. Comparación volumen óseo regenerado entre los grupos experimentales, medido con CBCT $p < 0,05$.

2.2.3 Comparación Volumen Óseo Regenerado Intragrupal: DBX y Colloss Lote 1 y Lote 2 (CBCT)

A continuación se estudió si en los grupos DBX y Colloss existían diferencias estadísticamente significativas intragrupal, atribuibles al Lote de producto utilizado, que como vimos en la Introducción, puede ser un factor que influya en el potencial de regeneración. Se utilizó un ANOVA para comparación de grupos de muestras independientes. El nivel de significación estadística para considerar una diferencia estadísticamente significativa fue del 0,05.

2.2.3.1. Comparación Intragrupal Colloss: Lote 1 y Lote 2 (CBCT)

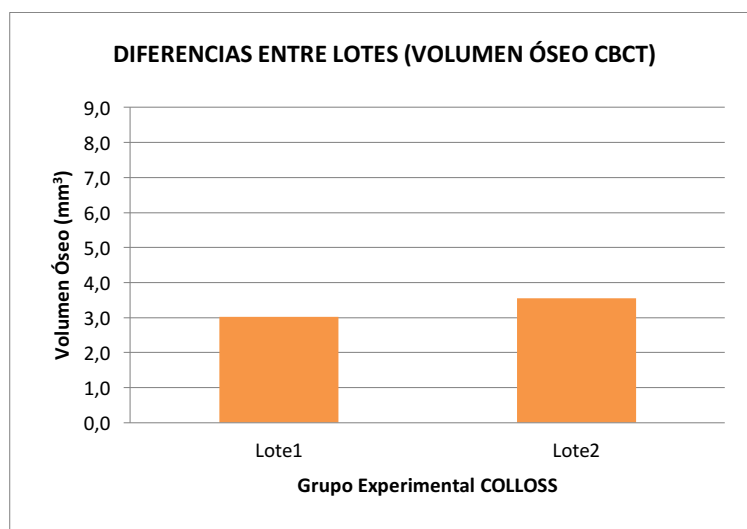


FIGURA 72. Volumen óseo en Grupo Experimental Colloss en función del lote de producto utilizado (CBCT).

El ANOVA univariante no ha detectado diferencias significativas entre ambos lotes ($p < 0,28$). El tamaño muestral pequeño ($n=5$) en cada subgrupo puede ser el motivo de no detectar diferencias estadísticamente significativas, en el caso de que las hubiera.

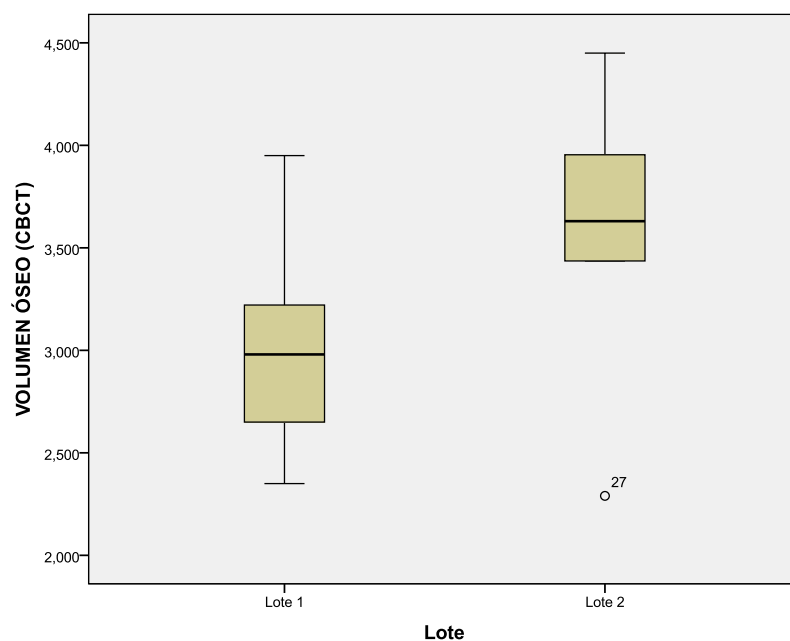


FIGURA 73. ANOVA univariante Grupo Experimental Collos Lotes 1 y 2 no detectó diferencias significativas entre ambos lotes ($p < 0,28$) (CBCT).

2.2.3.2. Comparación Intragrupal DBX: Lote 1 y Lote 2 (CBCT)

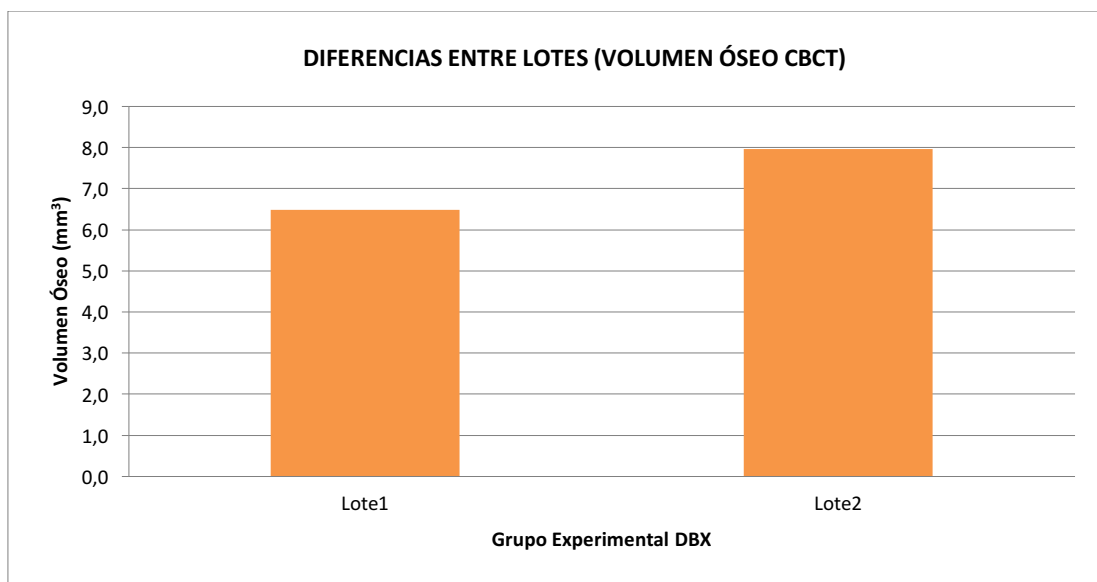


FIGURA 74. Volumen óseo en Grupo Experimental DBX en función del lote de producto utilizado (CBCT).

El ANOVA univariante no ha detectado diferencias significativas entre ambos lotes ($p < 0,37$). El tamaño muestra pequeño ($n=5$) en cada subgrupo puede ser el motivo de no detectar diferencias estadísticamente significativas, en el caso de que las hubiera.

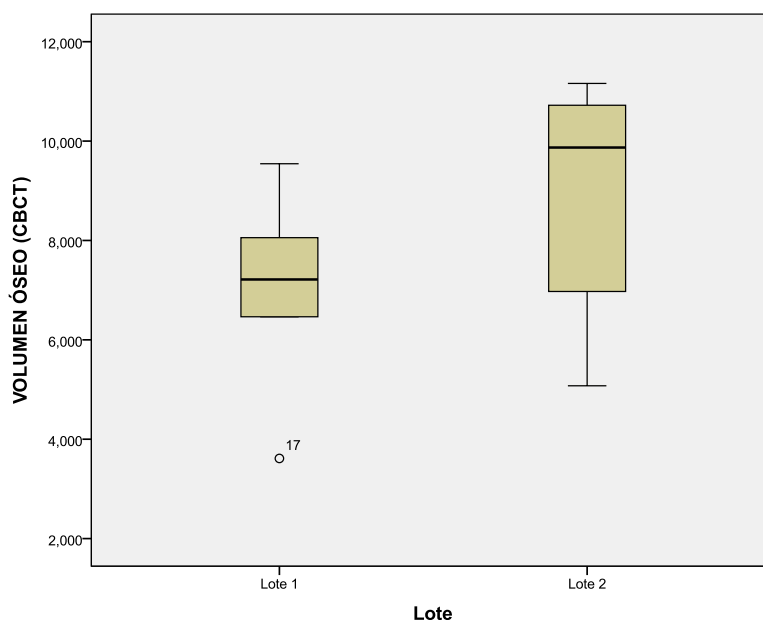


FIGURA 75. ANOVA univariante Grupo Experimental DBX Lotes 1 y 2 no detectó diferencias significativas entre ambos lotes ($p < 0,37$) (CBCT).

Concluimos por tanto que para los grupos experimentales DBX y Colloss no se han podido objetivar diferencias estadísticamente significativas de potencial regenerativo de ambos productos, por el hecho de utilizar diferentes lotes de producto en cada uno de ellos.

Posteriormente, se pudo realizar , como posteriormente detallaremos con el estudio histológico, un análisis comparativo entre los datos obtenidos con los métodos radiológicos frente a los hallazgos histológicos.

3. RESULTADOS TÉCNICAS HISTOLÓGICAS

3.1 ANÁLISIS HISTOLÓGICO CUALITATIVO

3.1.1. Consideraciones Generales

Se realizó el análisis histológico de la totalidad de cortes (coronales y parasagitales) seleccionados, según la secuencia descrita en el apartado 2.6 para su análisis estereológico. En todos los casos se realizaron tinciones tanto de Hemaroxilina-Eosina como de Tricrómico de Masson. En la práctica totalidad de los casos, se puede identificar el borde de la craneotomía con la amplificación del proyector de mesa. En aquellos casos dudosos, especialmente en lo referido al margen lateral en la escama del temporal, se procedía a explorar la muestra en el microscopio.

El límite de la craneotomía, se podía distinguir a nivel histológico por la diferente estructura y organización de las laminillas óseas. Así, en el hueso regenerado la estructura era más desorganizada con una menor orientación de las laminillas y con un mayor número de osteocitos en superficie, en comparación con el hueso nativo.

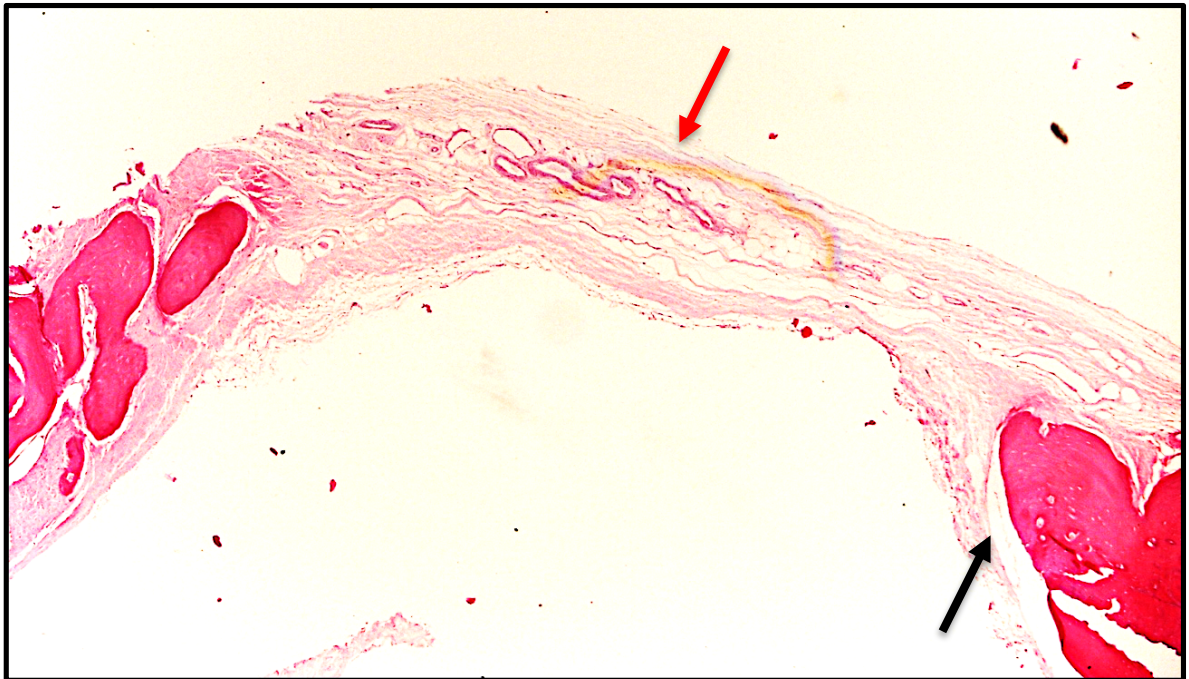


FIGURA 76. ID: COLLOSS 1. Visión panorámica que demuestra la ausencia de relleno óseo del defecto quirúrgico, ocupado por tejido conjuntivo fibroso con vasos y tejido adiposo (Flecha Roja) La flecha negra vertical señala el inicio de la regeneración ósea que como se puede ver es netamente incompleta sin rellenar el defecto crítico.

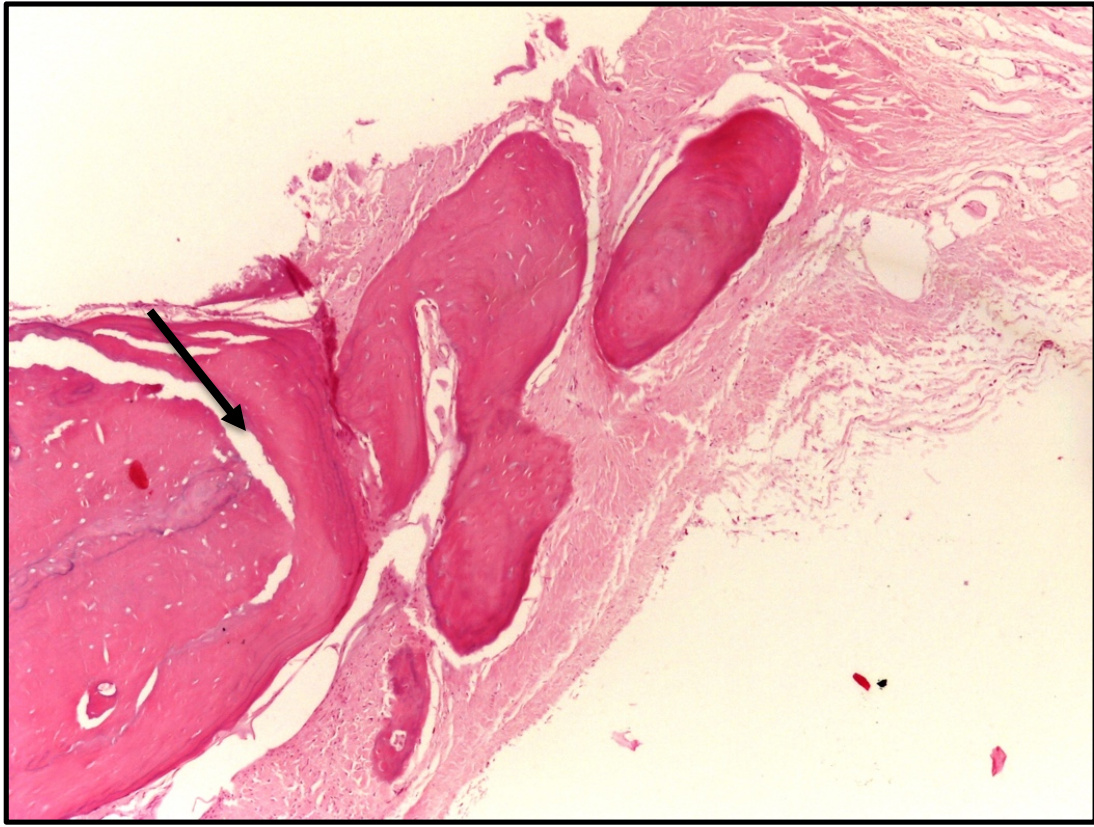


FIGURA 77. ID: COLLOSS 1. La flecha negra señala la existencia de una solución de continuidad, presente en algunas muestras entre el hueso nativo y el neoformado. Este defecto es un artefacto, resultado de la preparación histológica.

En la población en estudio se podía identificar el borde del defecto original en todas las muestras consistente en una hendidura perpendicular al tramado laminar óseo que separa por un lado al hueso nativo maduro y por el otro lado al hueso inmaduro regenerado o al tejido conjuntivo que rellena la cavidad del defecto óseo.

Se observaba también un revestimiento por osteoblastos aplanados o cuboideos dispuestos en monocapa tanto en el hueso nativo como en el hueso neoformado. En este

frente de crecimiento los osteoblastos pueden distribuirse en dos o tres capas y adquirir un hábito epitelioides. (**Figura 77**).

En todos los casos podemos observar que el hueso neoformado tiende a adelgazarse hacia la porción central del defecto óseo, estando revestido en una de sus caras por un periostio más o menos engrosado consistente en tejido conjuntivo fibroso denso. Además, como será comentado más adelante, la morfología del hueso regenerado era más parecida a la del hueso original en los grupos Control y DBX aunque también en estos grupos se pudo discriminar fácilmente entre el hueso original y el hueso regenerado.

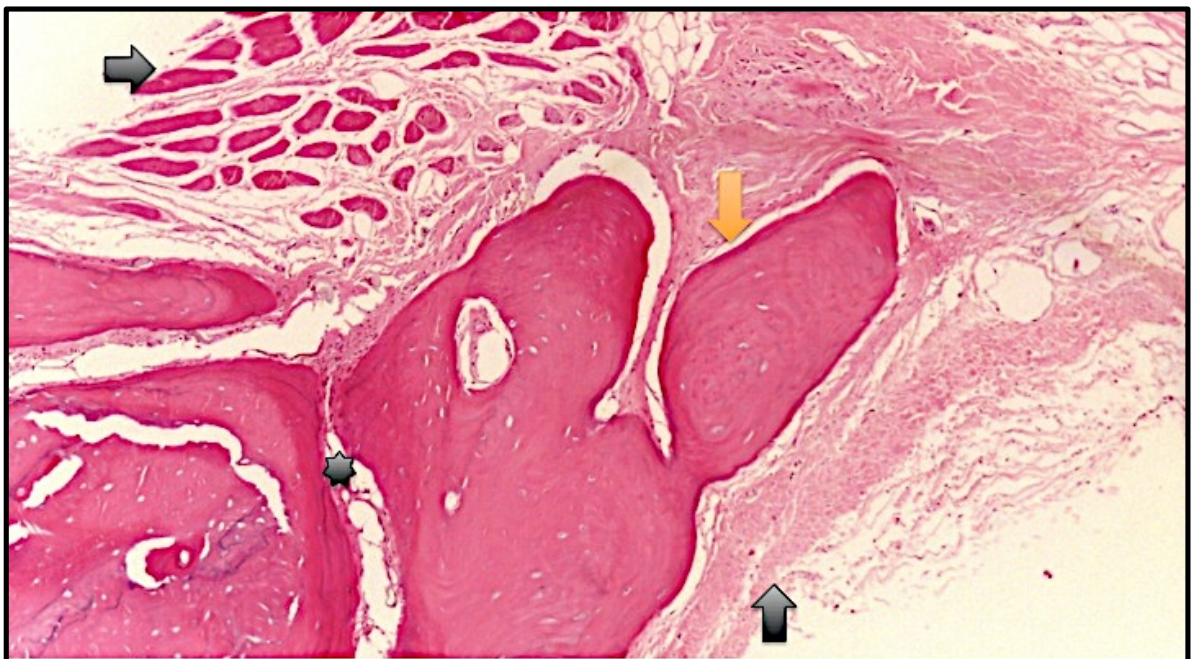


FIGURA 78. ID: Colloss 2. A mayor detalle podemos observar el artefacto de la interfase (estrella) entre el hueso nativo y el hueso neoformado (flecha amarilla). Se evidencia también la presencia de músculo estriado (flecha horizontal) que corresponde al músculo temporal así como el periostio de la zona dural (flecha negra vertical).

3.1.2. Gupo Control

En el grupo control, la apariencia general de las preparaciones histológicas era de escasa densidad celular en los tejidos observados. Podemos observar la ausencia de

regeneración ósea en la práctica totalidad de las muestras . Sólo en algunas, hay una incipiente regeneración ósea, siendo ésta incompleta y con un espesor de hueso inmaduro más delgado. En la gran mayoría de muestras se identifica con facilidad el borde del defecto óseo con un revestimiento por osteoblastos aplanados, y el defecto óseo ocupado por un tejido conjuntivo fibroso laxo con neoformación de capilares, tejido adiposo y tejido conjuntivo fibroso dispuesto en haces paralelos correspondientes al periostio nativo. Este hueso en todo momento estaba unido al hueso craneal original, es decir, no se observaron islas de hueso (separadas del borde óseo inicial) de tamaño significativo en ninguna de las preparaciones. En algunas muestras hay una incipiente regeneración ósea, siendo ésta incompleta y con un espesor de hueso inmaduro más delgado.



FIGURA 79. Espécimen Control 7. Se aprecia una regeneración ósea incompleta centripeta que se adelgaza progresivamente. La Flecha negra señala la existencia de una línea de cemento que delimita la transición entre el hueso nativo (Flecha Roja) y el frente de regeneración (Flecha amarilla).

3.1.3. Grupo DBX

En este grupo se observó el mayor grado de regeneración ósea de todos los grupos experimentales. La mayoría de los defectos estaban ocupados por una lámina de tejido óseo que puenteaba la totalidad de los mismos. El espesor del mismo oscilaba entre $1/3$ a $3/3$ del espesor del hueso nativo (**Figura 79**). Las características del tejido regenerado, son similares a las descritas en el grupo control con una preponderancia de laminillas irregularmente dispuestas y con mayor densidad celular de osteoblastos y osteocitos de superficie que en el hueso maduro.

La morfología del hueso regenerado sugería que varios nidos óseos separados habían crecido en el interior del defecto hasta coalescer, formando bloques óseos de tamaños variados (**Figura 80**).

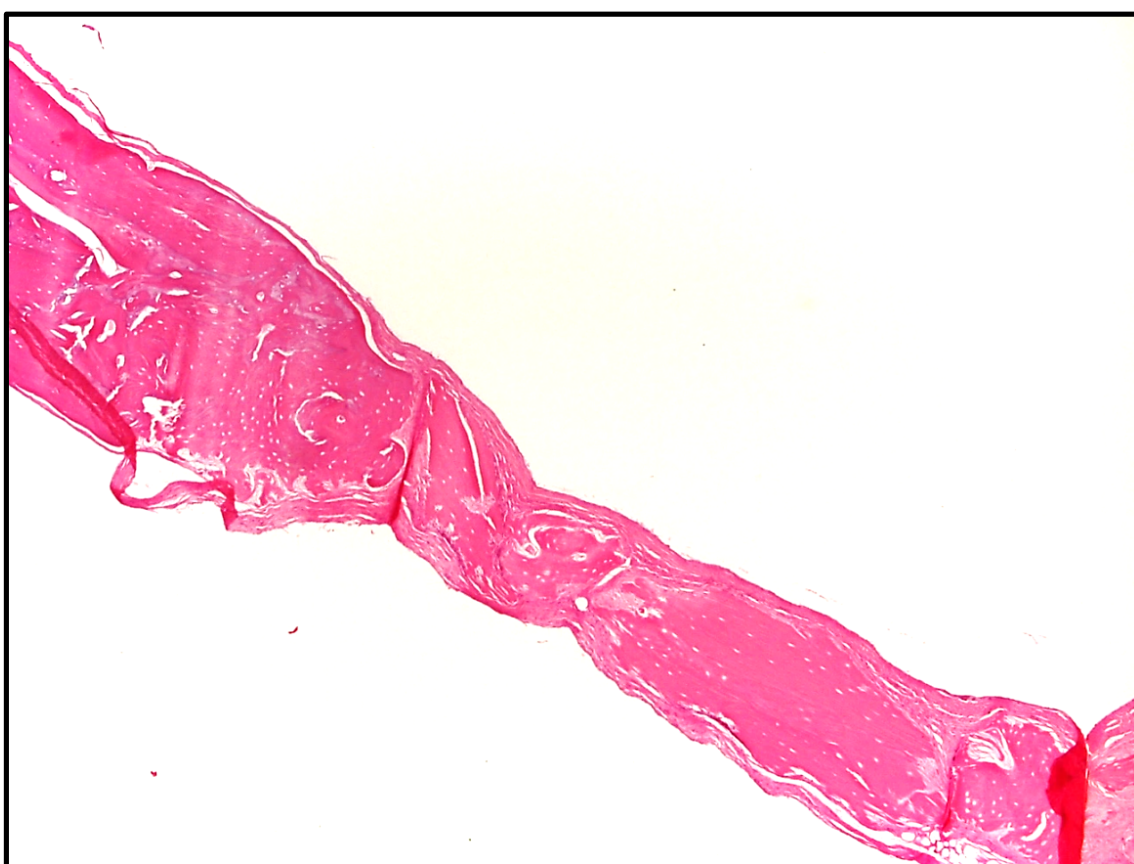


FIGURA 79. Espécimen DBX 9. Regeneración ósea con puenteado completo del defecto con trabéculas de tamaño irregular y grosor aproximadamente de $2/3$ del grosor del hueso nativo con una afinidad tintorial por Hematoxilina-Eosina muy similar.

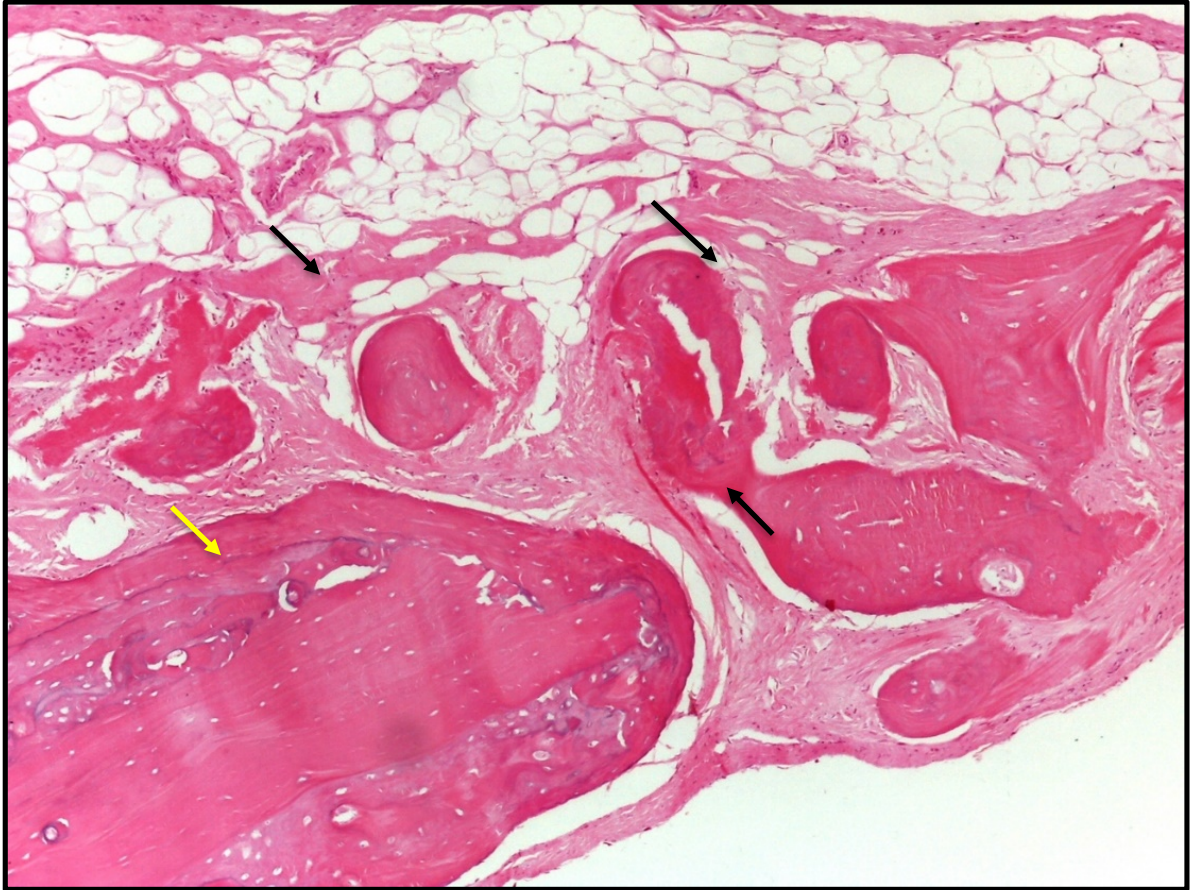


FIGURA 80. ID: DBX-8. Defecto óseo con puenteado completo que a mayor aumento muestra la presencia de nidos de osteoide maduro (Flecha Amarilla) e inmaduro (Flechas Negras) con tendencia a coalescer. El hueso inmaduro consiste en trabéculas irregulares en su grosor y disposición espacial.

En los defectos con mayor fenómeno regenerativo (DBX 2 y 6), se puede constatar, no sólo un puenteado completo del defecto, del mismo grosor que el hueso nativo, sino también la presencia de fenómenos de remodelación del hueso inmaduro (woven bone) a hueso maduro (**Figura 81**).

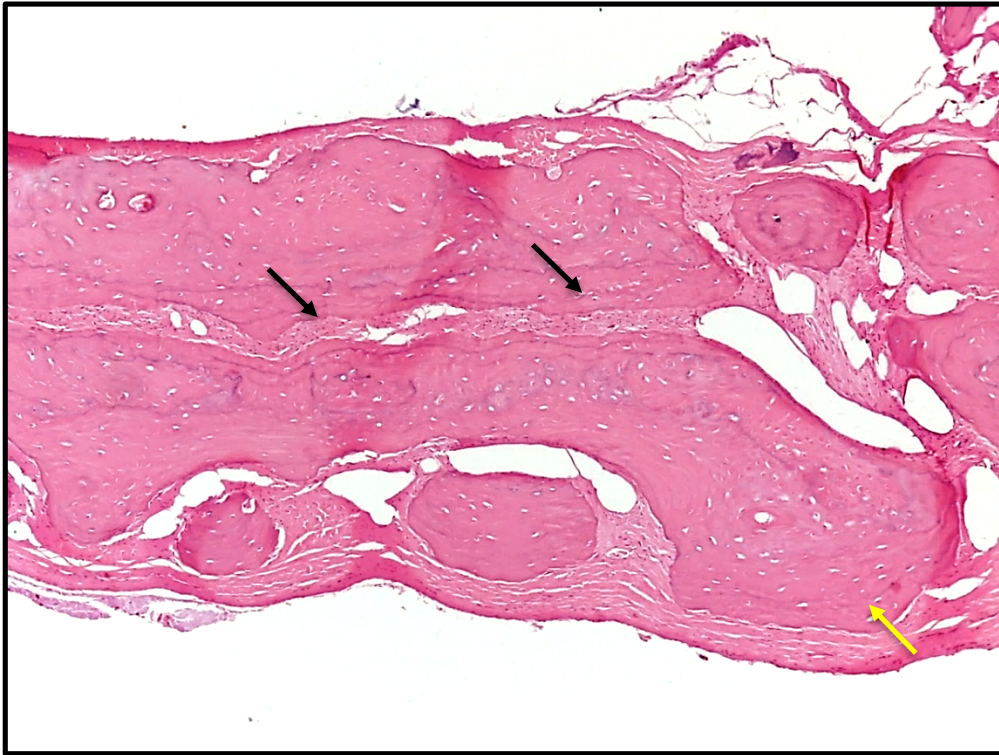


FIGURA 81. ID: DBX-2. Remodelación ósea del defecto, desde hueso joven (woven) a hueso maduro lamelar. Destacn las líneas de cimentación que se van disponiendo paralelas entre sí (Flecha Negra) o concéntricas a un sistema de Havers (Flecha Amarilla).

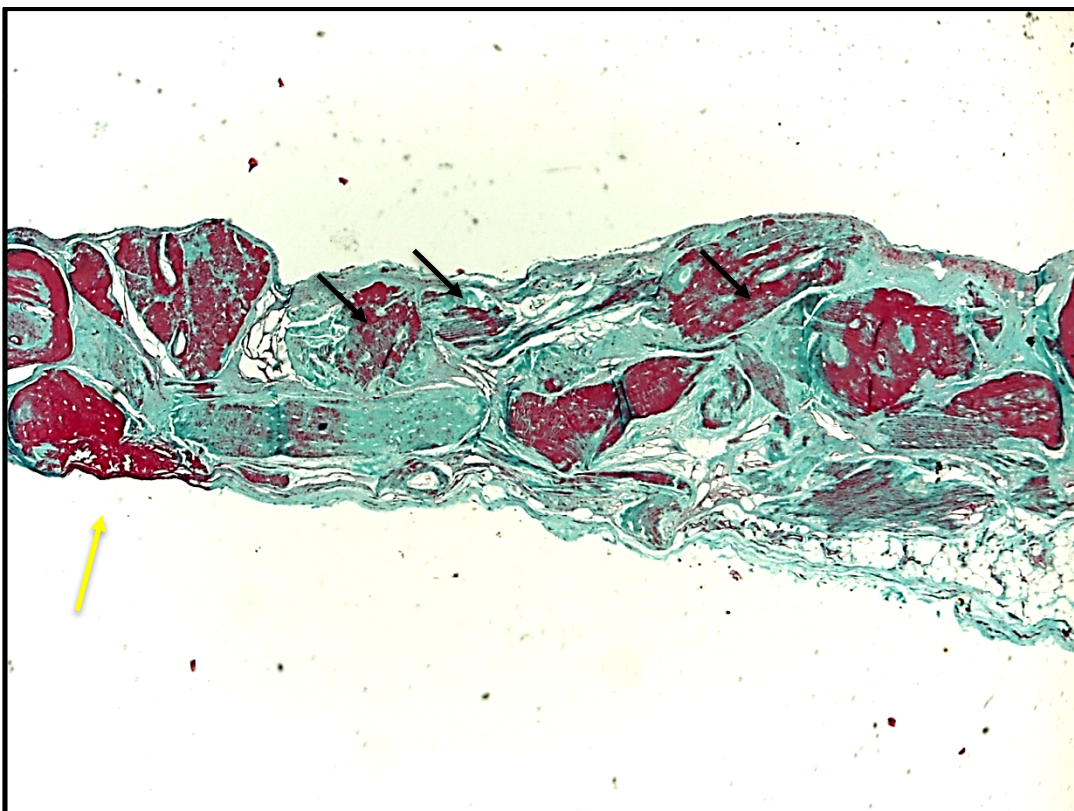


FIGURA 82. ID: DBX 4. Puenteado completo del defecto de grosor 2/3. El hueso inmaduro también se tiñe de rojo oscuro (Flecha Negra) , observándose la irregularidad de la trama ósea que la diferencia del lamelar definitivo (Flecha Amarilla).

3.1.4. Grupo Colloss

La regeneración ósea fue escasa en todos los animales de este grupo. El hueso regenerado se distinguió adecuadamente del hueso original conforme a los criterios enunciados anteriormente. La mayoría del hueso regenerado estaba conectado a los bordes del hueso original, y se disponía como una lámina ósea más fina que el hueso craneal nativo, que en ningún caso puenteaba el defecto completamente. El resto del defecto óseo estaba ocupado por un estroma de tejido conjuntivo laxo con las fibras colágenas orientadas paralelamente a la superficie ósea. No se observaron restos de Colloss, ni signos de reacción inflamatoria aguda ni crónica. Morfológicamente los hallazgos en conjunto resultaban muy similares a los del grupo “Control”. Sólo en un caso se produjo un puenteado completo del defecto (Colloss 8) con formación de tejido óseo inmaduro de un grosor 2/3 respecto al hueso nativo.



FIGURA 83. ID: COLLOSS 4. Con la tinción de tricrómico de Masson el hueso lamelar se tiñe de rojo y destacan las líneas de cimentación de los haces paralelos de colágeno sobre el que se deposita el mineral. El tejido conjuntivo fibroso que rellena el defecto se tiñe de color verde claro.



FIGURA 84. ID: COLLOSS 8. Puenteado completado del defecto con hueso inmaduro en remodelación a hueso lamelar con grandes lagunas Haversianas (Flecha Negra) y espesor de 1/3 a 2/3 del hueso maduro adyacente a la craneotomía.

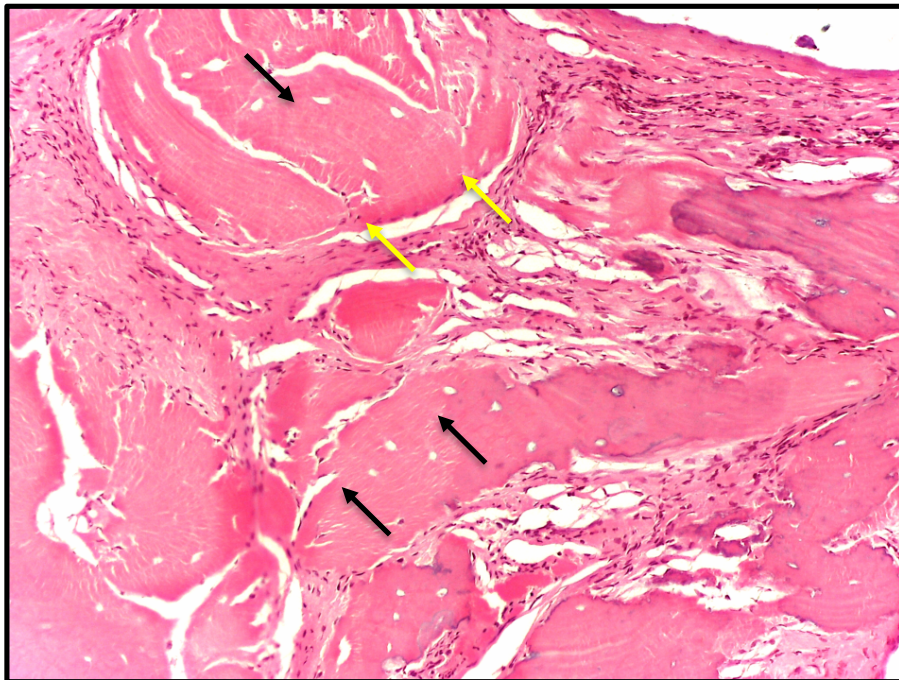


FIGURA 85. ID: COLLOSS 8. A mayor aumento, podemos observar en detalle la presencia de un hueso inmaduro (tipo woven) (Flecha amarilla) y un frente de remodelación con un ribete cuboideo de osteoblastos (Flechas Negras).

3.1.5. Grupo Bio-Oss

En esta población en estudio observamos unos amplios espacios ocupados por un material acelular que se tiñe de rosa pálido con Hematoxilina-Eosina y débilmente verdosa con técnica de tricrómico. Este material, ocupa una cavidad de mayor tamaño, debido a un artefacto de retracción generado en el procesamiento de la muestra, por la cual el biomaterial se retrae dejando un espacio que lo separa de la cavidad neoformada. En el frente de crecimiento óseo podemos identificar alguna trabécula joven que rodea parcialmente el biomaterial, acompañado mayoritariamente de tejido conjuntivo laxo y capilares de neoformación. No se aprecia componente inflamatorio destacable. El tejido que rodea el biomaterial consiste en fibras colágenas laxas y fibroblastos estrellados o elongados. No se evidenciaron signos de reabsorción osteoclástica del biomaterial. En todos los casos se pudo identificar una regeneración ósea centrípeta incompleta o incipiente rodeando a las partículas de biomaterial.

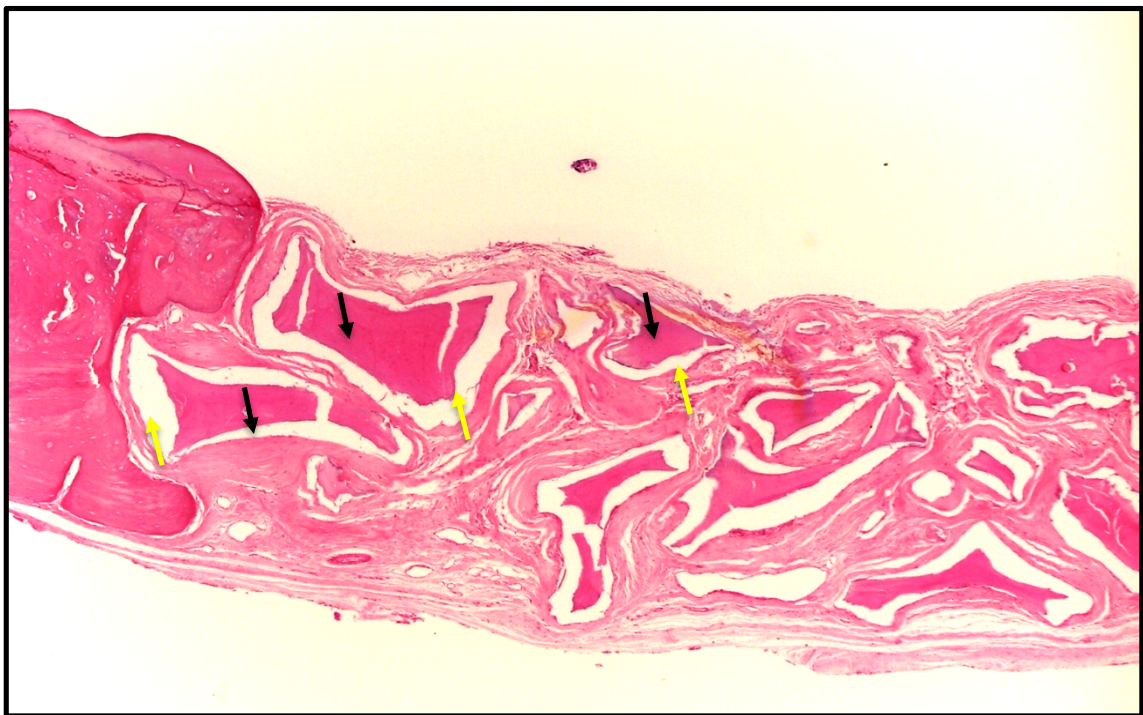


FIGURA 86. ID: BIO-OSS 3. Observamos la solución de continuidad ocupada por biomaterial (Flechas Negras) en las lagunas con fenómeno de retracción del estroma circundante (Flechas Amarillas). En la izquierda de la imagen se evidencia el frente de crecimiento óseo.

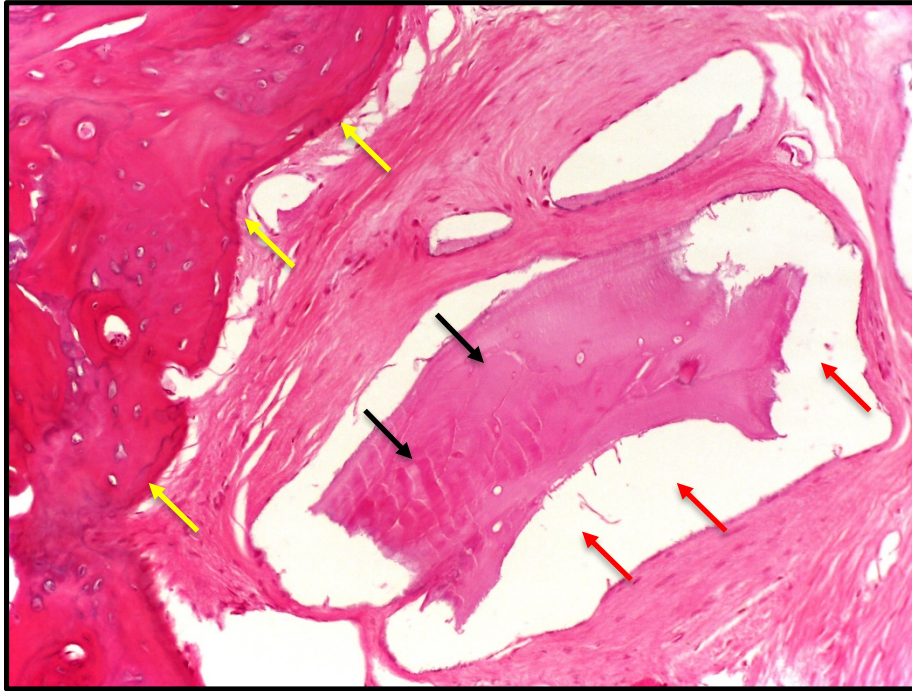


FIGURA 87. ID: BIO-OSS 7. A mayor aumento la imagen anterior en la que se aprecia el material de Bio-Oss (Flecha Negra) (débilmente eosinófilo) en el interior de una cavidad por el artefacto de retracción (Flecha Roja) así como la interfase del hueso lamelar (Flecha Amarilla).

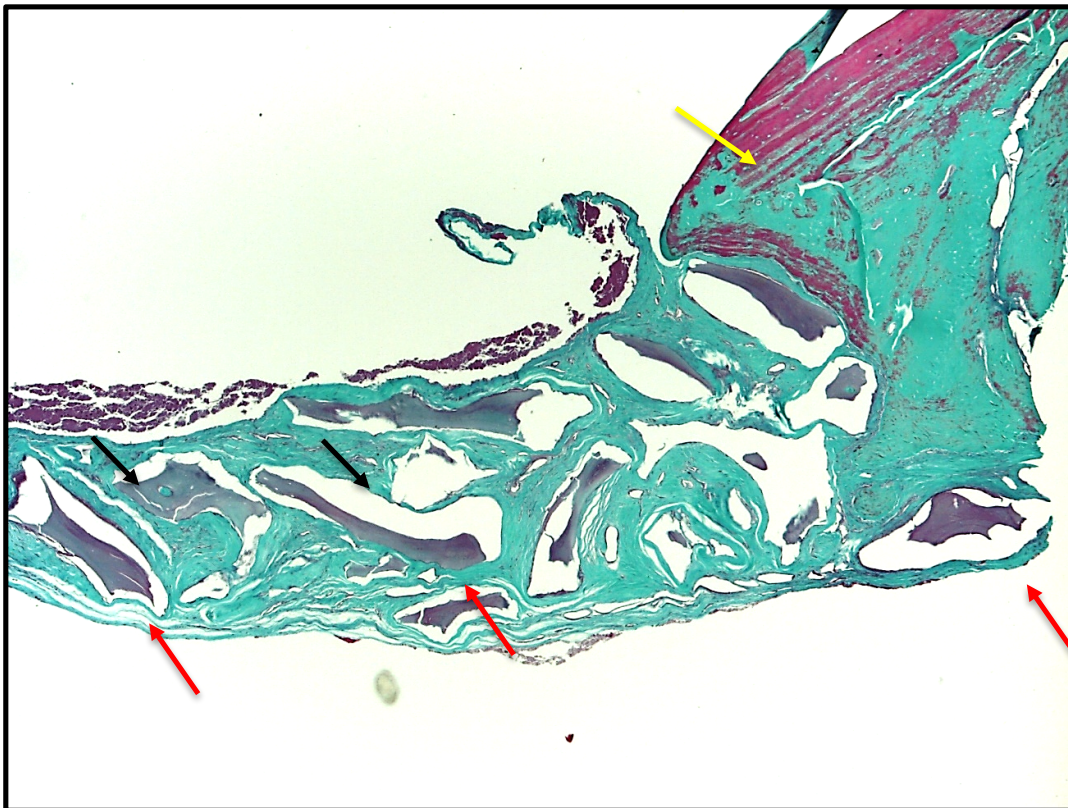


FIGURA 88. ID: BIO-OSS 8. En la tinción con tricrómico de Masson, observamos que el Bio-Oss se tiñe de un color azulado (Flecha Roja) diferencia del hueso maduro del huésped que se tiñe de un color granate (Flecha Amarilla). Observamos también el tejido conjuntivo laxo (Flecha Negra) rodeando a las partículas de Bio-Oss alojadas en el interior de las cavidades artefactuadas.

3.2 ANÁLISIS HISTOLÓGICO CUANTITATIVO

Una vez finalizado el análisis cualitativo de las muestras histológicas, se procedió a determinar el Volumen Óseo regenerado, mediante la Técnica de Cavalieri. Para ello se recogieron los impactos sagitales y parasagitales y se determinó el volumen óseo de cada compartimento tal y como se describe en el punto del apartado 2.6 de la sección de Material y Método. Los datos obtenidos se recogen en la **Tabla 12**.

TABLA 12. VOLUMEN ÓSEO REGENERADO EN LOS GRUPOS EXPERIMENTALES, MEDIDO CON CAVALIERI (mm³).

ID RATA	IMPACTOS CORONALES	IMPACTOS PARASAGITAL	VOLUMEN ÓSEO CORONAL	VOLUMEN ÓSEO PARASAGITAL	VOLUMEN ÓSEO TOTAL
CONTROL 1	147	109	1,764	2,616	4,38
CONTROL 2	124	95	1,488	2,280	3,768
CONTROL 3	94	68	1,128	1,632	2,76
CONTROL 4	97	69	1,164	1,656	2,82
CONTROL 5	100	71	1,200	1,704	2,904
CONTROL 6	153	92	1,836	2,208	4,044
CONTROL 7	112	74	1,344	1,776	3,12
CONTROL 8	96	67	1,152	1,608	2,76
CONTROL 9	117	86	1,404	2,064	3,468
CONTROL 10	131	102	1,572	2,448	4,02
DBX 1	221	186	2,652	4,464	7,116
DBX 2	315	275	3,780	6,600	10,02
DBX 3	205	146	2,460	3,504	5,964
DBX 4	154	106	1,848	2,544	4,392
DBX 5	260	98	3,120	2,352	5,472

DBX 6	310	241	3,720	5,784	9,504
DBX 7	136	54	1,632	1,296	2,928
DBX 8	290	114	3,480	2,736	6,216
DBX 9	325	210	3,900	5,040	8,94
DBX 10	270	221	3,240	5,304	8,544
COLLOSS 1	115	95	1,38	2,28	3,66
COLLOSS 2	94	69	1,128	1,656	2,78
COLLOSS 3	190	101	2,28	2,424	47
COLLOSS 4	276	191	4,512	2,944	7,456
COLLOSS 5	98	66	1,176	1,584	2,76
COLLOSS 6	112	89	1,344	2,136	3,48
COLLOSS 7	97	54	0,924	1,296	2,22
COLLOSS 8	101	78	1,212	1,872	3,084
COLLOSS 9	102	69	1,104	1,656	2,76
COLLOSS 10	99	86	1,188	2,064	3,252
BIO-OSS 1	133	61	1,596	1,464	3,06
BIO-OSS 2	106	32	1,272	0,768	2,04
BIO-OSS 3	95	49	1,140	1,176	2,316
BIO-OSS 4	103	81	1,236	1,944	3,18
BIO-OSS 5	67	21	0,804	0,504	1,308
BIO-OSS 6	89	36	1,068	0,864	1,932
BIO-OSS 7	35	27	0,420	0,648	1,068
BIO-OSS 8	96	58	1,152	1,392	2,544
BIO-OSS 9	83	39	0,996	0,936	1,93
BIO-OSS 10	114	41	1,368	0,984	2,352

3.2.1 Estadística Descriptiva

A partir de los datos recogidos en la **Tabla 12**, se efectuó la estadística descriptiva, recogida en la **Tabla 13** y expresada gráficamente en la **Figura 89**.

**TABLA 13. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA VOLUMEN ÓSEO REGENERADO
EN LOS GRUPOS EXPERIMENTALES, MEDIDO CON CAVALIERI.**

GRUPO		VOLUMEN ÓSEO REGENERADO (mm ³) (CAVALIERI)
Control	<i>N</i>	10
	<i>Media</i>	3,40440
	<i>Desv. típ.</i>	,612772
Colloss	<i>N</i>	10
	<i>Media</i>	2,25720
	<i>Desv. típ.</i>	,823445
Bio-Oss	<i>N</i>	10
	<i>Media</i>	2,17300
	<i>Desv. típ.</i>	,674538
DBX	<i>N</i>	10
	<i>Media</i>	6,90760
	<i>Desv. típ.</i>	2,327402

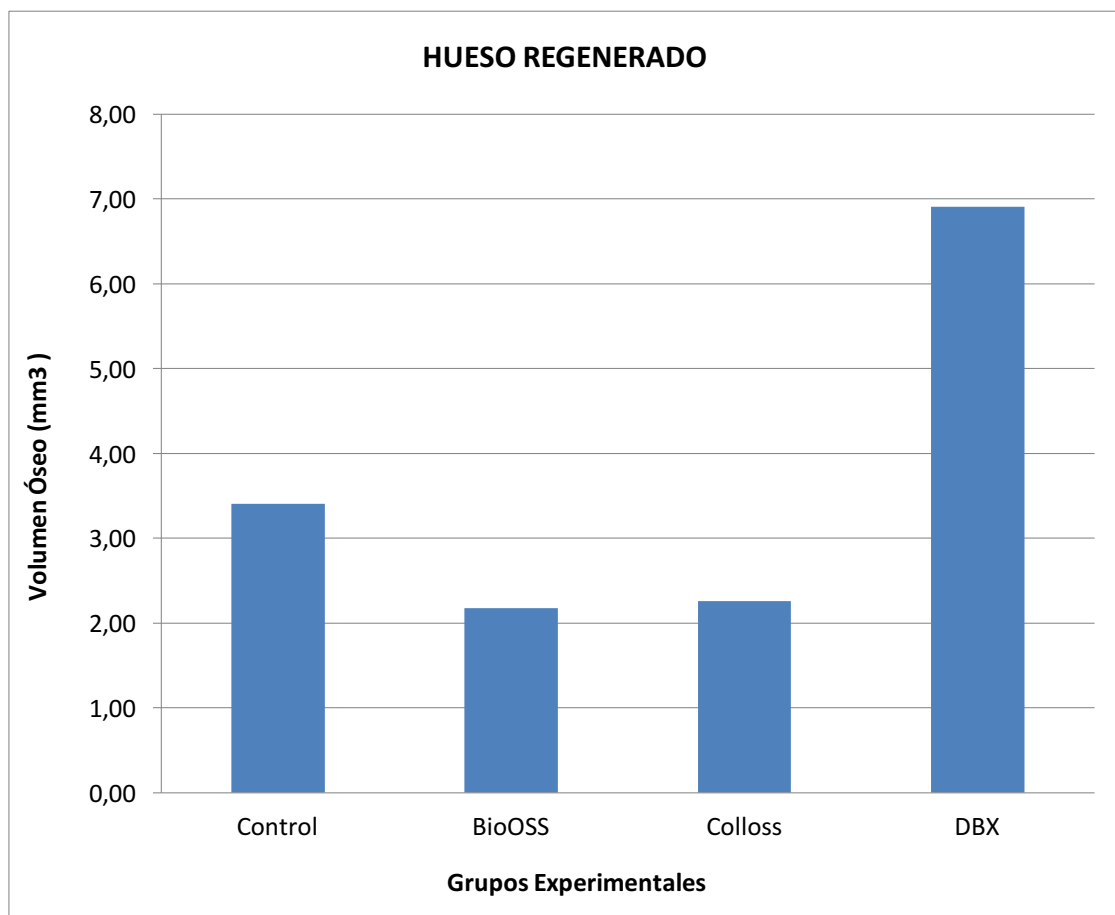


FIGURA 89. Volumen de hueso regenerado en cada grupo experimental determinado con Técnica de Cavalieri .

3.2.2. Cálculo del CV^2 vs CE^2 (Validación Análisis Estereológico de Cavalieri)

Para poder determinar, si los datos obtenidos a partir de la metodología de recuento de puntos, según la técnica de Cavalieri eran fiables para este modelo experimental, se procedió a calcular el CV^2 vs CE^2 tal y como recoge el punto 2.6.7.2 en el apartado de Material y Método. Los datos para su cálculo, se recogen en la **Tabla 14 y 15** y que se expresa gráficamente en la **Figura 90**.

TABLA 14. IMPACTOS CORONALES Y CÁLCULO DEL CE

ID RATA	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	Σ IMPACTOS CORONALES	CE CORONAL
CONTROL 1	29	31	27	25	23	12		147	0,063
CONTROL 2	26	27	24	23	24			124	0,085
CONTROL 3	23	22	21	19	19			94	0,096
CONTROL 4	20	21	20	28	17			97	0,086
CONTROL 5	23	23	24	17	13			100	0,079
CONTROL 6	27	32	29	27	20	18		153	0,061
CONTROL 7	25	26	25	23	13			112	0,073
CONTROL 8	20	21	21	18	16			96	0,078
CONTROL 9	22	26	24	23	12	10		117	0,064
CONTROL 10	30	31	26	20	13	11		131	0,073
DBX 1	46	52	39	37	27	20		221	0,065
DBX 2	69	73	62	50	30	21	10	315	0,064
DBX 3	46	50	36	30	24	19		205	0,071
DBX 4	31	37	35	28	23			154	0,059
DBX 5	50	61	52	43	28	26		260	0,061
DBX 6	61	65	53	47	40	24	20	310	0,061
DBX 7	30	33	27	18	17	11		136	0,069
DBX 8	57	65	50	42	41	25	10	290	0,058
DBX 9	68	72	61	41	40	25	18	325	0,064
DBX 10	51	57	55	54	31	22		270	0,059
COLLOSS 1	24	29	23	20	10	9		115	0,068
COLLOSS 2	20	22	19	19	14			94	0,112
COLLOSS 3	45	46	37	31	17	15		190	0,22
COLLOSS 4	26	27	24	24	25			126	0,085
COLLOSS 5	21	23	21	20	13			98	0,19
COLLOSS 6	23	26	24	21	18			112	0,19
COLLOSS 7	19	22	21	20	15			97	0,18
COLLOSS 8	20	23	22	21	15			101	0,069
COLLOSS 9	22	22	21	15	12	10		102	0,073
COLLOSS 10	19	21	22	20	10	7		99	0,096
BIO-OSS 1	31	32	25	20	13	8		133	0,076
BIO-OSS 2	21	24	20	15	15	11		106	0,073
BIO-OSS 3	19	22	20	20	15			95	0,079

TABLA 15.
IMPACTOS
SAGITALES

BIO-OSS 4	20	24	21	17	21			103	
BIO-OSS 5	18	21	16	12				67	
BIO-OSS 6	19	22	19	15	14			89	
BIO-OSS 7	8	10	7	6	4			35	
BIO-OSS 8	20	21	19	19	17			96	
BIO-OSS 9	17	24	18	14	10			83	
BIO-OSS 10	22	25	23	20	13	11		114	

Y CÁLCULO DEL CE SAGITAL

ID RATA	S1	S2	S3	S4	S5	S6	Σ IMPACTOS PARASAGITALES	CE SAGITAL
CONTROL 1	23	25	20	17	14	9	108	0,067
CONTROL 2	21	23	21	15	8	7	95	0,071
CONTROL 3	21	10	11	9	9	8	68	0,129
CONTROL 4	19	12	10	8	9	8	69	0,106
CONTROL 5	18	15	11	7	10	10	71	0,097
CONTROL 6	20	22	21	14	9	6	92	0,069
CONTROL 7	24	12	11	11	10	6	74	0,135
CONTROL 8	12	18	17	9	11		67	0,085
CONTROL 9	14	20	15	13	12	12	86	0,068
CONTROL 10	25	21	17	19	11	9	102	0,087
DBX 1	36	44	38	30	21	17	186	0,059
DBX 2	47	61	67	52	30	18	275	0,06
DBX 3	23	24	39	30	17	13	146	0,067
DBX 4	21	23	23	20	11	8	106	0,069
DBX 5	19	17	25	16	12	9	98	0,08
DBX 6	45	59	52	46	25	14	241	0,054
DBX 7	15	10	8	7	8	6	54	0,107
DBX 8	20	24	27	16	14	13	114	0,098
DBX 9	32	48	45	41	33	11	210	0,047
DBX 10	35	54	42	46	31	13	221	0,054
COLLOSS 1	19	17	25	14	13	12	95	0,123
COLLOSS 2	11	14	12	12	11	9	69	0,082
COLLOSS 3	20	18	19	17	16	11	101	0,086
COLLOSS 4	16	14	15	15	12	9	81	0,092
COLLOSS 5	13	16	10	11	11	5	66	0,13
COLLOSS 6	17	18	18	15	11	10	89	0,132
COLLOSS 7	11	12	12	10	5	3	54	0,121
COLLOSS 8	15	19	18	13	13		78	0,077

Resultados

COLLOSS 9	14	14	16	10	7	8	69	0,129
COLLOSS 10	16	12	21	18	10	9	86	0,09
BIO-OSS 1	10	13	11	10	10	7	61	0,079
BIO-OSS 2	6	7	5	4	5	5	32	0,12
BIO-OSS 3	11	11	12	10	5		49	0,097
BIO-OSS 4	15	19	18	13	10	6	81	0,071
BIO-OSS 5	5	5	4	3	4		21	0,166
BIO-OSS 6	9	10	8	4	5		36	0,122
BIO-OSS 7	7	12	4	2	2		27	0,21
BIO-OSS 8	13	13	11	10	7	4	58	0,091
BIO-OSS 9	7	10	8	7	7		39	0,142
BIO-OSS 10	7	11	7	8	5	3	41	0,104

A la vista de los resultados obtenidos, se determinó que el análisis estereológico con la técnica de Cavalieri era lo suficientemente preciso como para continuar el análisis estadístico, toda vez que el cálculo del CE^2 está en rango, tal y como recoge la **Ecuación 11** del apartado **2.6.7.2**.

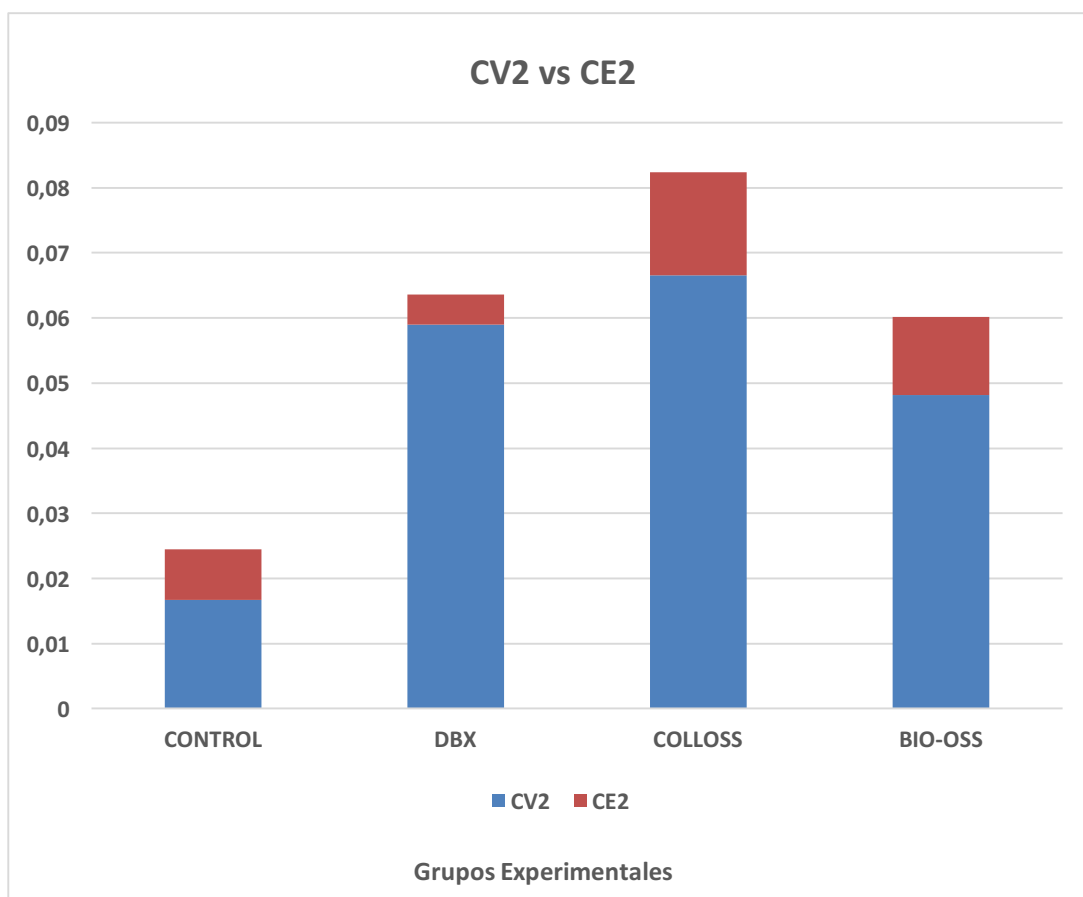


FIGURA 90. Comparación entre CV^2 y CE^2 en los grupos experimentales.

3.2.3. Comparación Volumen Óseo Regenerado Intergrupar (Cavalieri)

De forma análoga al proceso realizado en el apartado 2.2.2, en primer lugar se analizó si los datos recogidos seguían o no una distribución normal. Para ello se aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Esta prueba evidenció que los datos de todos los grupos siguen una distribución normal. Por tanto, la prueba utilizada para hacer la comparación entre grupos fue un ANOVA para comparación de grupos de muestras independientes.

El nivel de significación estadística para considerar una diferencia estadísticamente significativa fue del 0,05.

El ANOVA univariante ha evidenciado que existen diferencias significativas ($p < 0,0001$) en esta variable debidas al GRUPO. Para realizar las comparaciones entre grupos se han utilizado las pruebas post hoc Tukey, Scheffé y Bonferroni. Según estas pruebas es el grupo DBX el que presenta diferencias significativas con el resto de grupos ($p < 0,0001$). Sería este grupo el que presenta un potencial de regeneración significativamente más alto que el resto de grupos. En el análisis detallado intergrupos se puede apreciar que Collos y Bio-Oss no presentan diferencias significativas entre sí o respecto al grupo Control. Es decir, el único grupo de tratamiento que muestra diferencias significativas en términos de volumen de hueso regenerado respecto al grupo Control es DBX.

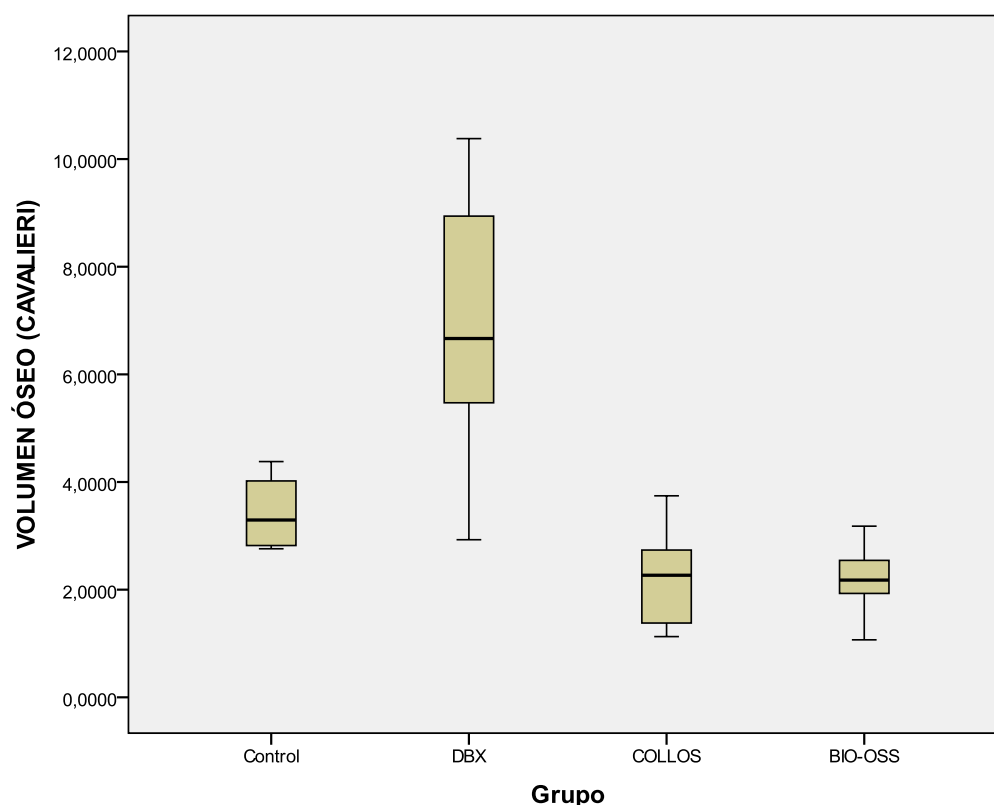


FIGURA 91. ANOVA. Comparación volumen óseo regenerado entre los grupos experimentales, medido con CBCT $p < 0,05$.

Vemos por tanto, que existe una discrepancia entre los resultados obtenidos con CBCT (donde DBX y Bio-Oss tenían diferencias significativas respecto al resto de

grupos, con resultados similares entre ellos) frente a los obtenidos con el Método de Cavalieri, donde sólo DBX muestra diferencias estadísticamente significativas. Posteriormente se analizará esta discrepancia.

3.2.4. Comparación Intragrupal DBX y Collos: lotes 1 y 2 (Cavalieri)

A continuación se estudió, al igual que con los datos obtenidos a partir del CBCT, si en los grupos DBX y Colloss existían diferencias estadísticamente significativas intragrupales, atribuibles al lote de producto utilizado, que como vimos en la Introducción, puede ser un factor que influya en el potencial de regeneración.

Se realizó igualmente un ANOVA para comparación de grupos de muestras independientes. El nivel de significación estadística para considerar una diferencia estadísticamente significativa será del 0,05.

Al igual que sucedió con los datos obtenidos con CBCT, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes lotes de producto para los Grupos Colloss y Bio-Oss.

3.2.4.1 Comparación Intragrupal Collos: Lote 1 y Lote 2 (Cavalieri)

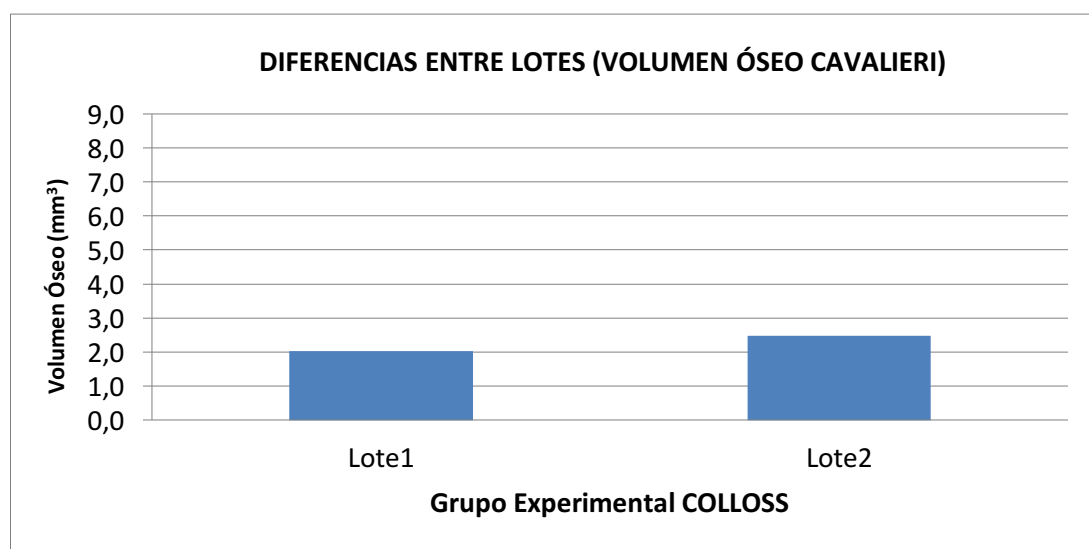


FIGURA 92. Volumen óseo en Grupo Experimental Colloss en función del lote de producto utilizado (DBX).

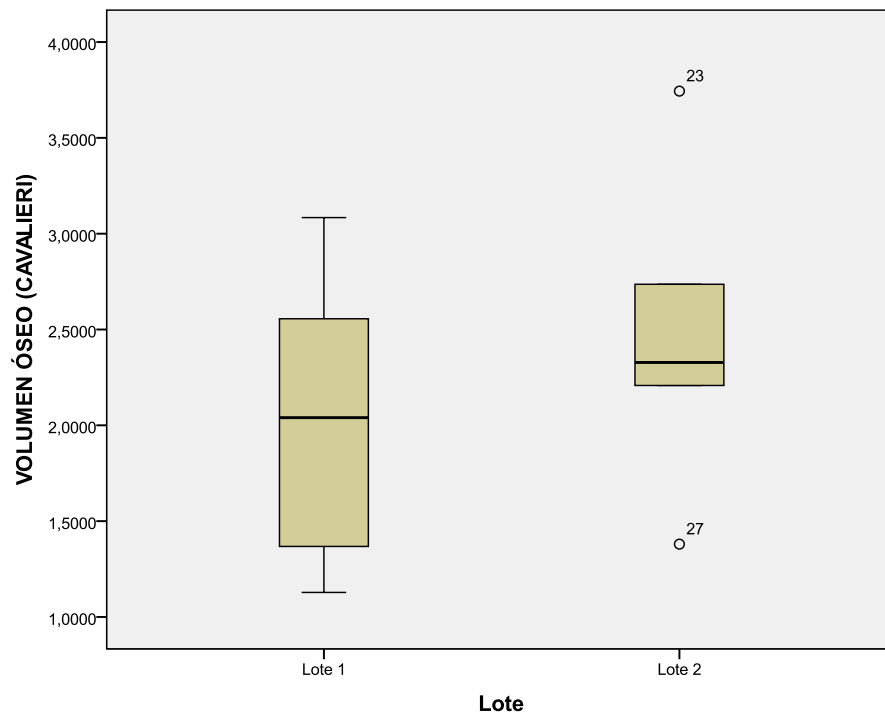


FIGURA 93. ANOVA univariante Grupo Experimental Colloss Lotes 1 y 2 no detectó diferencias significativas entre ambos lotes ($p < 0,42$) (Cavalieri).

3.2.4.2 Comparación Intragrupal DBX: Lote 1 y Lote 2

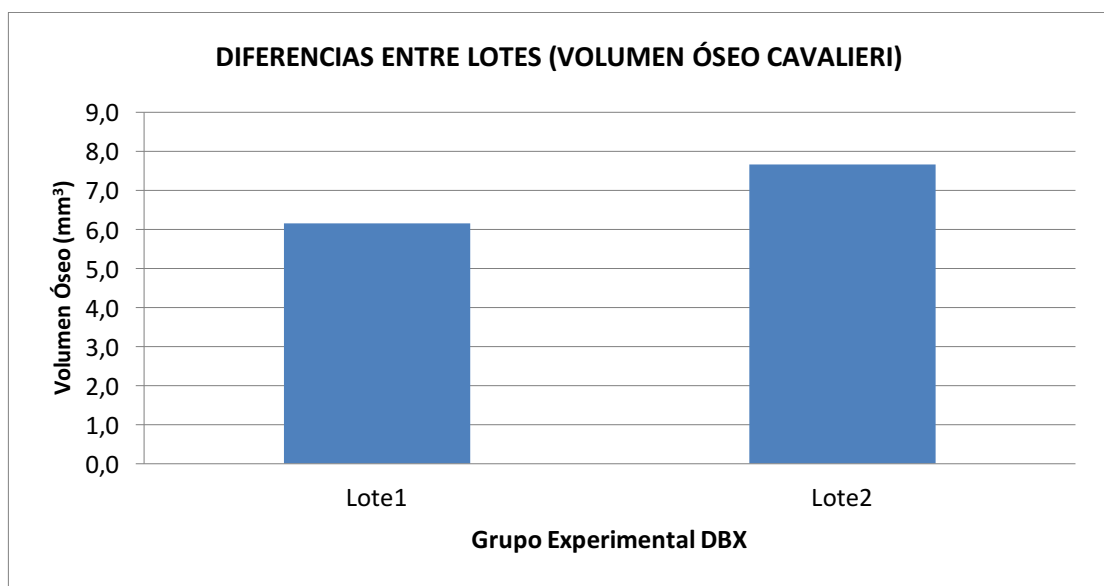


FIGURA 94. Volumen óseo en Grupo Experimental DBX en función del lote de producto utilizado (Cavalieri).

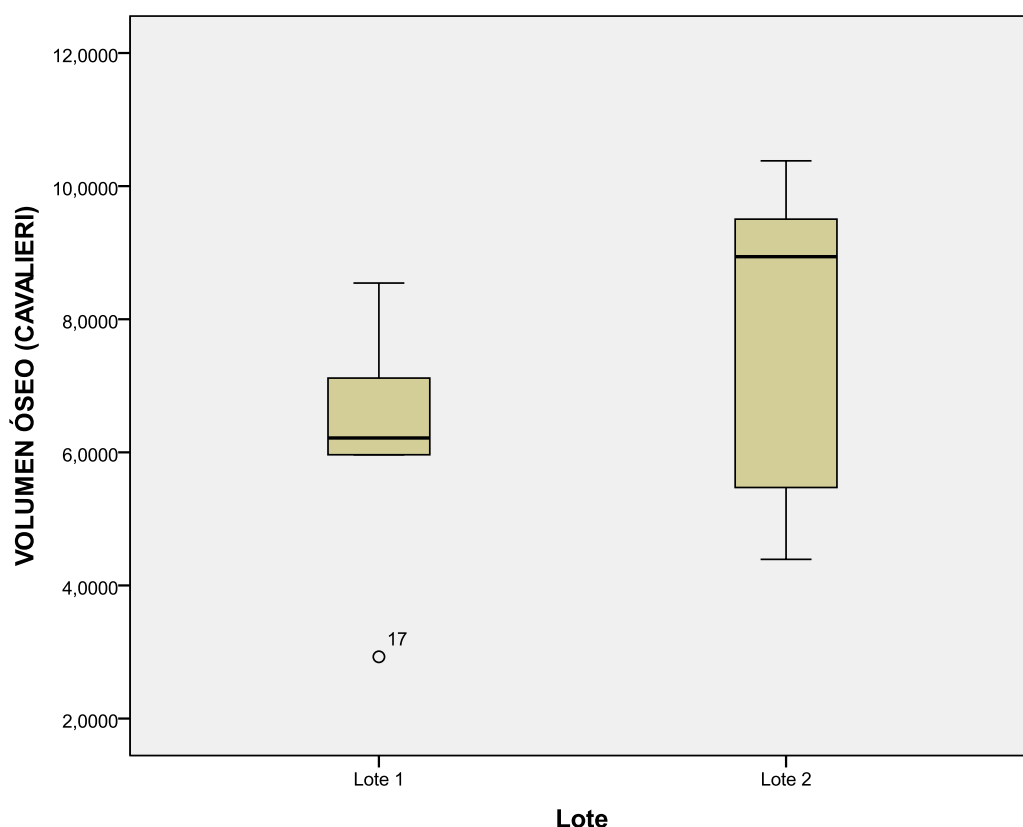


FIGURA 95. ANOVA univariante Grupo Experimental Colloss Lotes 1 y 2 no detectó diferencias significativas entre ambos lotes ($p < 0,33$) (Cavalieri)..

4.- ANÁLISIS DE CORRELACIÓN CAVALIERI VS CBCT

Finalmente se realizó el análisis estadístico para tratar de comparar, si existe relación entre el volumen óseo calculado con Cavalieri vs CBCT, en los 4 grupos experimentales. Esto es, si son comparables ambas técnicas de medición del Volumen Óseo regenerado.

Como hemos visto, existen discrepancias en cuanto a significación estadística entre CBCT vs Cavalieri. Con las mediciones obtenidas con CBCT, DBX y Bio-Oss tenían diferencias significativas respecto al resto de grupos, con resultados similares entre ellos, mientras que con el método de Cavalieri sólo se obtienen diferencias significativas a favor del grupo DBX respecto al resto de Grupos Control y Tratamiento.

Dichas diferencias quedan ejemplificadas en la **Figura 96** donde el volumen de hueso regenerado medido con CBCT para el grupo Bio-Oss es netamente superior al medido con la Técnica de Cavalieri.

Estas discrepancias, concuerdan con el hecho de que el Bio-Oss es un biomaterial con una radiodensidad de base sustancialmente mayor que DBX y Colloss que básicamente en su composición carecen de mineral al tratarse, valga la redundancia de matrices óseas desmineralizadas.

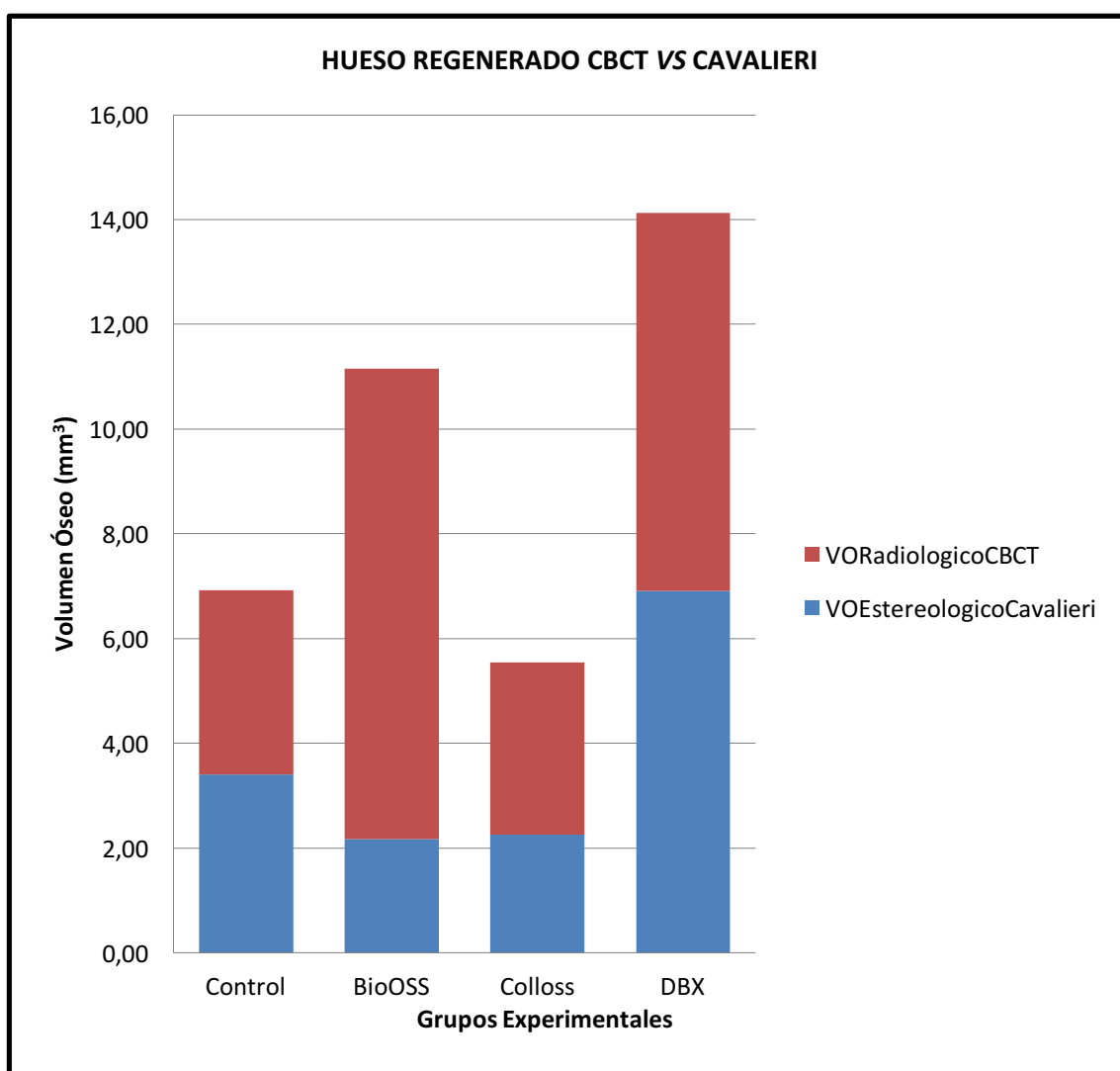


FIGURA 96. Comparativo de las medidas de volumen de hueso regenerado en los cuatros grupos experimentales obtenidas con Técnica de Cavlieri frente a CBCT.

Para intentar explicar esta discrepancia entre las medidas por Cavalieri y por CBCT, hemos realizado un análisis de regresión lineal, siendo la variable dependiente el valor óseo medido por CBCT, e introduciendo como variables dependientes el valor óseo medido por Cavalieri, y el grupo de tratamiento. Se realizó regresión lineal por método de retirada de variables stepwise, sin incluir constante de base.

Coeficientes ^{a,b}						
Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados		
		B	Error típ.	Beta		
1	VOLUMEN ÓSEO (CAVALIERI)	1,159	,043	,756	27,221	,000
	Grupo Dbx	-,182	,347	-,014	-,524	,604
	Grupo Colloss	,675	,205	,050	3,292	,002
	Grupo BioOss	6,459	,203	,483	31,773	,000
2	VOLUMEN ÓSEO (CAVALIERI)	1,140	,022	,744	51,799	,000
	Grupo Colloss	,718	,186	,054	3,859	,000
	Grupo BioOss	6,501	,186	,486	35,043	,000

a. Variable dependiente: VOLUMEN ÓSEO (CBCT)

b. Regresión lineal a través del origen

FIGURA 97. Análisis de Regresión Lineal CBCT vs Cavalieri.

A partir de los resultados recogidos en la Figura 92, se pudo determinar una ecuación de regresión lineal. Es decir, el volumen óseo medido por CBCT puede calcularse con la siguiente fórmula, que explica el 99,3% del valor medido por CBCT:

$$\text{CBCT} = 1.140 * \text{Cavalieri} + 0,718 (\text{si Colloss}) + 6,501 (\text{si Bio-Oss})$$

Se desprende del resultado anterior, que en términos generales, con el método CBCT se sobreestima sistemáticamente la medida ósea por Cavalieri en un 14% extra, y

además si se usa matriz Colloss se sobreestima en 0,718 y si se usa Bio-Oss en 6,501. El uso de matriz DBX no artefacta la medida por CBCT.

En una representación gráfica, vemos la agrupación de los datos para las variables Control (**Figura 93**), Colloss (**Figura 94**), DBX (**Figura 95**) y Bio-Oss (**Figura 96**) con ambas técnicas y la dispersión de los mismos para Bio-Oss.

Por tanto, a la vista de los datos, CBCT en el presente proyecto experimental no se puede considerar un método de medida equiparable a Cavalieri, con ciertas salvedades que posteriormente detallaremos en el apartado de Discusión, pues sobreestima la masa osea, y se artefacta con ciertas matrices.

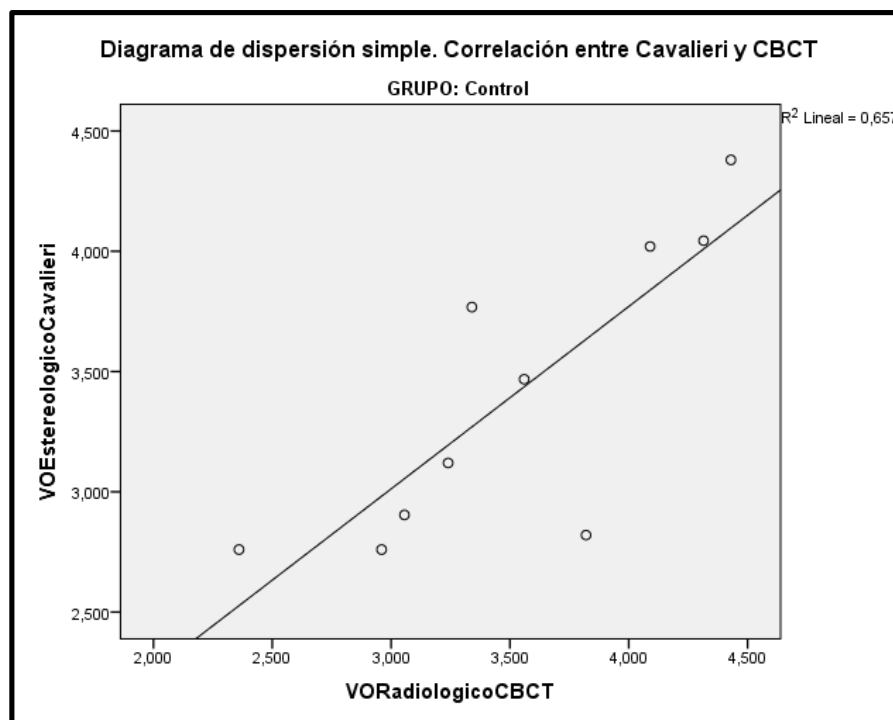


FIGURA 98. Diagrama de Dispersión para Grupo Control CBCT vs Cavalieri

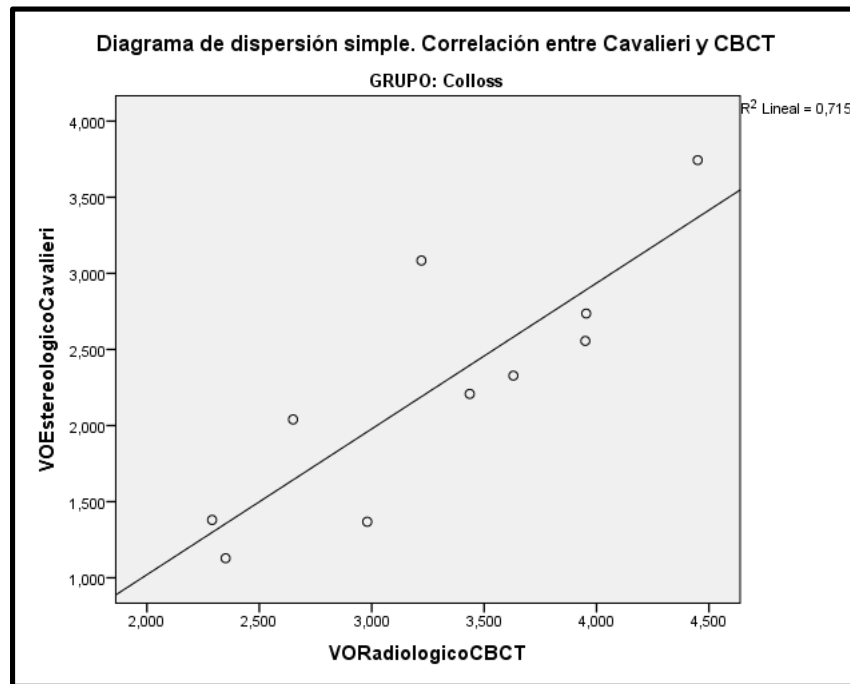


FIGURA 99. Diagrama de Dispersión para Grupo Colloss CBCT vs Cavalieri

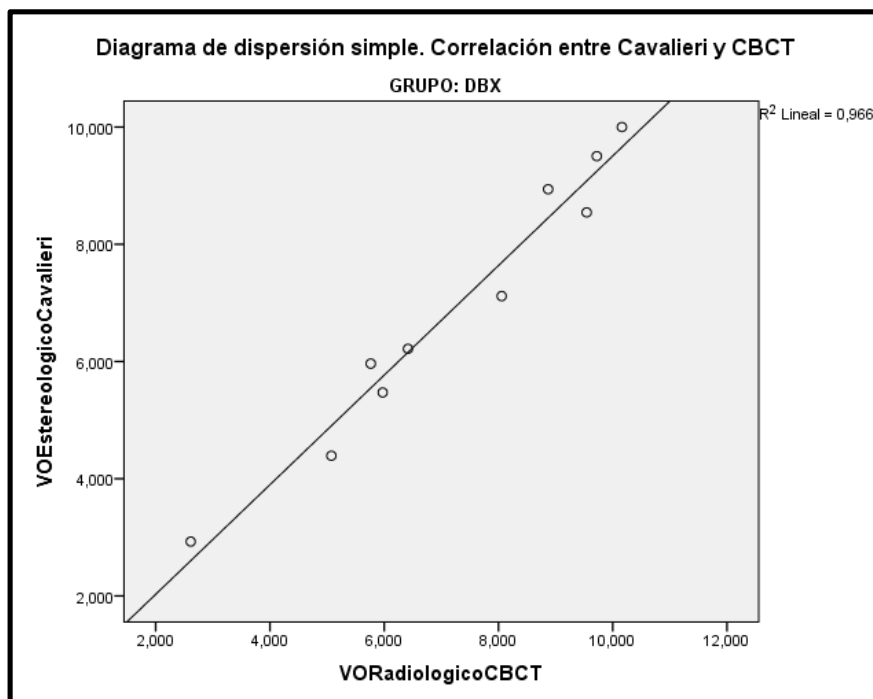


FIGURA 100. Diagrama de Dispersión para Grupo DBX CBCT vs Cavalieri

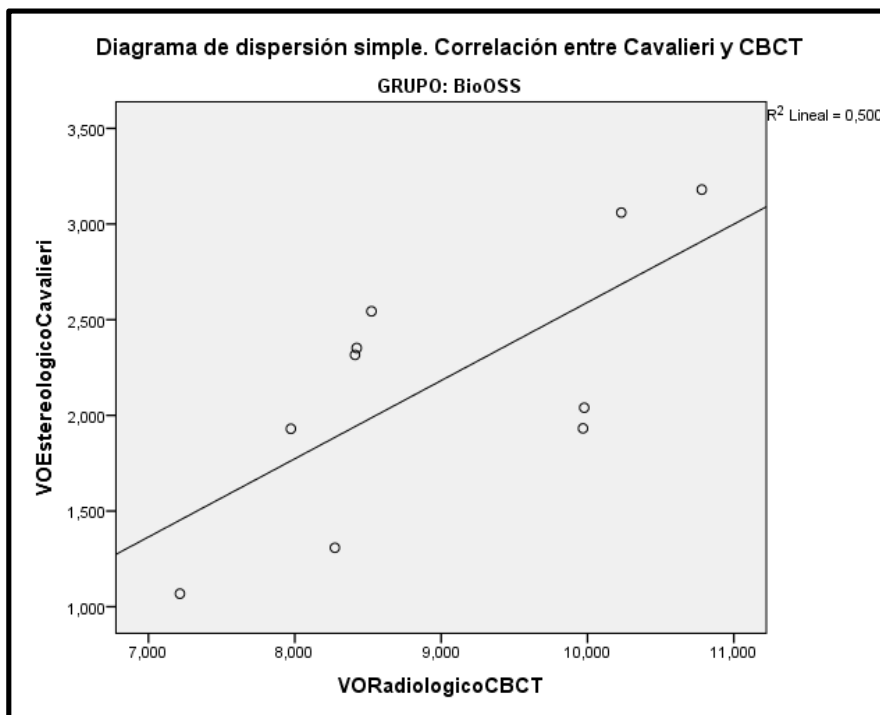


FIGURA 101. Diagrama de Dispersión para Grupo Control Bio-Oss vs Cavalieri

DISCUSIÓN

1. MODELO EXPERIMENTAL

1.1 ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN

Tal y como se detalló en el apartado de **Introducción**, probablemente el factor más decisivo en estudios de regeneración ósea es la elección adecuada del modelo experimental. Se han descrito numerosos modelos de regeneración ósea en animales. De todos ellos los más utilizados en el ámbito de la regeneración craneo-maxilofacial han sido los modelos que utilizaban defectos óseos de tamaño conocido, generados por el propio investigador⁶.

De acuerdo con Muschler et al²¹⁴, los modelos de ingeniería tisular ósea deben tratar de imitar las condiciones clínicas y biológicas que se van a valorar; deben permitir la determinación de diversos parámetros que permitan cuantificar cualitativa y cuantitativamente el tejido regenerado y que deben facilitar la identificación de posibles diferencias entre distintos modelos experimentales biológicos por sus características inherentes. Bosch²¹¹ añade que los animales de experimentación idealmente deben ser baratos y accesibles, fáciles de manejar ya anestesiarse: el hueso estudiado debe incluir una parte cortical y otra medular; se debe asegurar la estabilidad mecánica en el lecho de regeneración y el riesgo de fractura debe ser mínimo²⁶¹.

Por otro lado, en términos de extrapolación de los resultados experimentales a la práctica clínica en humanos y tal como se describió a la el punto 9 de la Introducción, lo ideal teóricamente, por su proximidad filogenética y similitud biológica, sería utilizar modelos experimentales en Primates no humanos (NHPs)¹³³. La realidad es bien diferente. A las limitaciones inherentes al enorme coste material y las consideraciones éticas se añade que a pesar de su proximidad filogenética, existe también variabilidad de los resultados obtenidos que a su vez condiciona su traslación a la clínica. Por poner un

ejemplo, los babuinos, han demostrado ser hipersensibles a la administración de proteínas óseas morfogenéticas¹⁴⁷.

De esta forma, en condiciones normales, para modelos preclínicos, se tiende a utilizar grandes cuadrúpedos (ovejas, cerdos, perros, cabra, etc.), cuya composición y estructura del tejido óseo es muy similar al ser humano. Esto es, cuanto mayor sea la necesidad de realizar traslación de los datos experimentales a la clínica, más complejo y similar al humano, debe ser el modelo experimental, con la salvedad de los NHPS²¹⁴.

Por otro lado, la relación entre la capacidad regenerativa y el tamaño del animal no siempre es lineal. Así, por ejemplo, la rata parece tener menor capacidad osteorregenerativa que el conejo²²⁰.

Respecto a a esta consideración inicial, desde un principio, el objetivo del presente proyecto de Tesis Doctoral, no ha sido buscar una extrapolación directa de los datos obtenidos a la clínica humana. Así, los componentes testados (DBX[®], Collos-E[®] y Bio-Oss[®]) ya están disponibles para su utilización en humanos en situaciones en las que se precisa estimular la regeneración del tejido óseo. Lo llamativo es que realmente el clínico no tiene herramientas para saber la “potencia” real de estos componentes. Así, la indicación para su utilización vendrá determinada, inicialmente por la información facilitada por la empresa comercializadora y secundariamente por ensayos de “acierto/error” en sus propios pacientes. Consideramos que en el contexto científico, clínico y ético actual esto es inadmisibile. Máxime cuando es relativamente sencillo, desde un punto de vista científico, no comercial, por razones evidentes, testar de forma estandarizada los diferentes compuestos en un modelo conocido y fiable de regeneración ósea y así elaborar una suerte de escala de potencia de los compuestos osteoinductivos/osteoconductivos.

Es por ello que quisimos conocer, en términos absolutos, el verdadero potencial

osteogénico de dos matrices óseas desmineralizadas (DBX[®] y Collos-E[®]) y no tanto buscar una extrapolación directa de los datos obtenidos al plano de la práctica clínica. Así, se buscó un modelo experimental solvente, con un coste razonable y de fácil manejo por el experimentador.

De todos los modelos disponibles, se decidió utilizar el modelo de craneotomía en cráneo de rata. Utilizado desde hace más de 100 años¹⁴⁹ en experimentación de regeneración ósea, la rata sigue siendo, hoy, en día, tal y como señala O'Loughlin²⁶¹ y colaboradores el animal más empleado (38%) en los estudios de regeneración ósea, seguido a gran distancia por el conejo (19%) y el ratón (13%).

El empleo de la Rata como animal experimental tiene numerosas ventajas, ya enumeradas en apartados anteriormente y que simplemente resumiremos a continuación.

A saber:

- Facilidad en el manejo de los animales.
- Similitud anatómica con el esqueleto craneofacial humano a pesar de no disponer de sistemas haversianos.
- Debido a su elevado potencial regenerativo, escaso tiempo de latencia (en el rango de 3 meses) para la obtención de resultados.
- Disponibilidad muy elevada.
- Coste relativamente bajo.

Durante la realización del procedimiento experimental se pudieron comprobar las características anteriormente mencionadas.

Como posibles contraindicaciones podríamos señalar fundamentalmente que: disponen de una cantidad menor de hueso trabecular y de remodelación Haversiana y que presentan remodelación continua de su esqueleto durante todo su ciclo vital²¹⁶. Estos factores, deben ser tenidos especialmente en cuenta cuando se evalúe la resistencia y

características funcionales del tejido regenerado, donde la remodelación y el ratio hueso cortical/hueso trabecular son determinantes. No supuso un inconveniente en el diseño experimental, por cuanto que se pretendía evaluar el potencial puro regenerativo a 3 meses.

Con el fin de minimizar las variables anteriormente comentadas, se emplearon ratas Sprague Dawley macho adultas. La utilización de machos se fundamenta en que no están sujetos a cambios cíclicos hormonales. Como alternativa se podría haber utilizado un modelo muy útil de osteoporosis en ratas hembras a las que se les practica una ooforectomía bilateral²¹¹.

En cuanto a la edad de los animales utilizados, se decidió utilizar animales de 6-7 meses de edad cuyo crecimiento esquelético ya ha finalizado por su teórico menor potencial regenerativo. Los resultados obtenidos en el grupo control en los que se produjo una ausencia de regeneración espontánea en la mayor parte de los animales, ponen de manifiesto lo acertado de la elección de ratas macho adultas.

1.2 DEFECTOS DE TAMAÑO CRÍTICO DE CRÁNEO DE RATA

Aunque el modelo de craniectomía en la rata es el más utilizado a la hora de estudiar la regeneración del hueso membranoso, se han descrito otros modelos en diferentes localizaciones. Así por ejemplo, el ángulo mandibular de la rata tiene un tamaño suficiente como para hacer un orificio de espesor total de 5 mm de diámetro sin provocar una fractura de mandíbula, y que también resulta ser un defecto de tamaño crítico²¹². Una vez perfeccionada la técnica quirúrgica en los animales de prueba, junto con la modificación de completar la craniectomía con una trefina diamantada, se comprobó que

era un procedimiento quirúrgico, sencillo de realizar y reproducible. No obstante, los defectos de tamaño crítico en mandíbula de rata son más sencillos de realizar y al no tener el hándicap de la presencia de la duramadre, es excepcional que se desechen animales durante la fase quirúrgica. Recomendamos por tanto, en caso de limitación en el número de animales disponibles para experimentación o falta de entrenamiento con técnicas de microcirugía, utilizar preferentemente los defectos mandibulares.

Por otro lado, la estabilidad mecánica del defecto, es otro factor de distorsión en los resultados y también es una causa potencial de infección. En este sentido, la estabilidad mecánica del defecto craneal de rata es superior a otras localizaciones²¹³. Este fue uno de los factores por los que también elegimos esta localización. Dado que en nuestro estudio no hemos empleado material alguno (véase membranas de colágeno, mallas de titanio, etc) con el fin de estabilizar el injerto. El objetivo era estudiar el potencial aislado de dichos compuestos y como está descrito la utilización de sistemas de barrera como las membranas de colágeno que estabilizan los injertos, interfiere en los resultados puesto que favorece de forma significativa el proceso regenerativo. En este sentido y dado que DBX[®] en su formulación Putty con carrier del 93% de ácido hialurónico y Collos-E[®] eran extremadamente maleables, se quiso buscar la máxima estabilidad mecánica del biomaterial²⁶².

Otro de los factores decisivos a valorar es el tamaño del defecto. La definición exacta de los defectos de tamaño crítico en los modelos experimentales de regeneración ósea es siempre motivo de controversia independientemente de su localización. Teóricamente, el defecto de tamaño crítico debe ser lo suficientemente extenso como para impedir una regeneración espontánea del hueso que pueda interferir con los resultados inducidos por los biomateriales o técnicas a testar. Los defectos craneales más utilizados en rata han

sido defectos de espesor total craneal con forma circular, de 3, 5 y 8 mm de diámetro²¹².

Hemos descartado para nuestro modelo experimental los defectos de 3 mm, a pesar de que la craniectomía se puede circunscribir muy fácilmente al hueso parietal sin afectar a la línea media ni al hueso temporal y que técnicamente resultan muy sencillos. El principal inconveniente es que regeneran totalmente de forma espontánea²¹¹, por lo que son poco útiles para evaluar la influencia positiva que pudieran tener los materiales de estudio.

También hemos descartado los defectos de 8 mm de diámetro, a pesar de que a causa de su gran tamaño no cabe duda de que no van a regenerar espontáneamente. Desgraciadamente, debido al tamaño del cráneo de la rata, los defectos de 8 mm deben estar centrados en la línea media, por lo que durante la cirugía se pone en peligro la integridad del seno sagital. El daño de este seno venoso ocasiona la pérdida de un número considerable de animales por hemorragia incoercible. Además, los defectos de este tamaño siempre interesan a la sutura sagital. El crecimiento de los tejidos blandos a partir de ésta puede por sí solo inhibir la regeneración ósea²¹⁶.

Por tanto, hemos elegido utilizar defectos de 5 mm que no regeneran espontáneamente. De este modo la craniectomía queda circunscrita a un hemicráneo, y por lo tanto, teóricamente sería posible efectuar craniectomías bilaterales, separadas por la sutura sagital, de forma que cada animal fuera su propio control. No obstante, existe todavía gran controversia sobre la idoneidad de los defectos de 5 mm. Así, Park et al^{203,263} consideran que a las 8 semanas, los defectos de 5mm presentan cantidades significativas de regeneración ósea espontánea. Por el contrario, Vajgel et al²²⁶ realizaron en 2.014 una revisión sistemática de la literatura sobre los defectos de tamaño crítico de cráneo de rata con el fin de aclarar qué medidas pueden considerarse verdaderamente de tamaño crítico.

Incluyeron un total de 61 artículos para revisión y determinaron, que en conjunto, el porcentaje de hueso neoformado en defectos únicos de 5 mm de diámetro a 1 y 3 meses, era del 18,29% y del 21,44%, respectivamente. Concluyeron por tanto, que los defectos de cráneo de rata unilaterales de 5mm de diámetro, pueden considerarse como defectos de tamaño crítico. No obstante, enfatizaban la necesidad de estandarizar dichos defectos, con el fin de facilitar sucesivas comparaciones entre los diferentes estudios.

En nuestro modelo experimental, hemos podido comprobar, a tenor de los resultados observados en el grupo control que, efectivamente, los defectos de 5 mm de diámetro de cráneo de rata se comportan como defectos de tamaño crítico.

Otro de los puntos a valorar es la duración del procedimiento experimental. Se eligió una duración de 12 semanas porque de acuerdo con Bosch²¹¹ es el tiempo recomendable para estudiar fenómenos regenerativos óseos con la característica principal de que en esta fase, es posible todavía delimitar la interfase entre el hueso regenerado y el hueso nativo. En fases posteriores, los fenómenos de remodelación hacen que sea mucho más difícil señalar estos límites. Como bien pudimos comprobar en nuestra fase experimental, 12 semanas es un tiempo adecuado de latencia. Así en el grupo experimental en el que más se indujo la regeneración (DBX) con puentes completos del defecto óseo, todavía era sencillo delimitar la interfase entre el hueso regenerado y el hueso nativo. Esta delimitación era especialmente evidente en las muestras histológicas, no así en las reconstrucciones 3D de las imágenes radiológicas. En las primeras, era evidente dicho límite entre el hueso nativo y el frente de regeneración gracias a la presencia de una separación artefactada de dichos frentes, consecuencia de los procesos de descalcificación y fijación.

Por otro lado, la base teórica de actuación de las matrices óseas desmineralizadas, tal y como vimos en la Introducción, es la puesta en marcha del mecanismo de osteogénesis en cascada por actuación de las BMPs o proteínas óseas morfogenéticas^{115,121}. Dicho proceso, precisa de un periodo de latencia y actuación lo suficientemente amplio como para que el mecanismo de osteoinducción sea máximo. Con latencias de menor cuantía, no es factible discernir si un proceso regenerativo insuficiente es consecuencia de la escasa potencialidad del biomaterial o del escaso tiempo concedido para su actuación. En el presente proyecto, y a tenor de los resultados obtenidos, 12 semanas de latencia es tiempo suficiente, no sólo para la puesta en marcha del fenómeno regenerativo, sino incluso para el desarrollo activo de fenómenos de remodelación de hueso inmaduro a hueso maduro.

Finalmente, como consecuencia de los procedimientos analíticos a realizar (Histológico con muestras descalcificadas y radiológico) se valoró que con un periodo de 12 semanas de cicatrización ósea el hueso observado estaría mineralizado, de acuerdo con los hallazgos referidos por Schmitz²¹⁶ y Alberius⁵⁵. En este sentido, los resultados obtenidos mostraron una adecuada mineralización del tejido óseo regenerado.

2. MATERIALES DE INVESTIGACIÓN UTILIZADOS

2.1 DBX®

De todos los factores utilizados en el procedimiento experimental, DBX mostró el mayor potencial regenerativo. En términos de manejo, DBX en su formulación Putty se mostró incómodo de manejar con una tendencia a la disgregación en contacto con la

sangre. El defecto de craneotomía de rata, al ser esencialmente plano (con una profundidad de aproximadamente 0,8 mm, hacía que en ocasiones fuese complicado retener el biomaterial. A pesar de ello, no se detectaron problemas (infección, inflamación, etc.) que pudieran sugerir una migración del producto. Igualmente, no se detectó ningún fenómeno de osificación heterotópica.

En términos generales, la regeneración ósea fue satisfactoria, con un puentado completo de los defectos en la mayor parte de los animales. El espesor del hueso regenerado era variable, y en ningún caso se equiparaba al hueso de los márgenes de la craneotomía. Fundamentalmente era hueso inmaduro en una fase incipiente de remodelación.

Si valoramos la teórica capacidad de osificación heterotópica de la matriz ósea desmineralizada, llama la atención que, salvo en un caso que se formó un islote de hueso en la zona central de la craneotomía, en el resto de casos, la osificación se produjo de forma centrípeto a partir de los bordes de la misma.

Uno de los factores a valorar era la ausencia de complicaciones relacionadas con la aplicación de la DBM. En este sentido, recientes publicaciones han puesto de manifiesto la aparición de complicaciones (seromas, osificación heterotópica, eyaculación retrógrada e incluso aumento del riesgo de cáncer) relacionadas con la aplicación *in vivo* de diferentes matrices óseas desmineralizadas con dosis suprafisiológicas de BMP-2²⁶⁵. Así, en formulaciones aisladas de proteína ósea morfogenética humana rh-BMP, el “efecto lavado” sobre la BMP, determina que en la actualidad, la dosis recomendada de BMP por la FDA para procedimientos de regeneración ósea (fundamentalmente fusión espinal) es de 1,5 ng/ml, o lo que es lo mismo varios órdenes de magnitud por encima de la dosificación fisiológica^{265,266}.

En 2013 se publicaron dos meta-análisis en el *Annals of Internal Medicine*²⁶⁵ en el que

se estudiaba la utilización de rh-BMP-2 para la fusión espinal. Se obtuvieron 4 conclusiones:

- No había datos suficientes que justificasen un aumento las tasas de fusión utilizando rh-BMP-2 en comparación con el autoinjerto de cresta iliaca.
- Tanto BMP-2 como el injerto de cresta iliaac, se asocian con una tasa de complicaciones neurológicas y eyaculación retrógrada similar cuando se utilizan en procedimientos de fusión posterolateral y que no se relaciona tanto con el tipo de injerto utilizado como de las condiciones del paciente.
- Existe evidencia clara en relación a la mayor incidencia de complicaciones en procedimientos cervicales anteriores con la utilización de rh-BMP-2, así como de osificación heterotópica en procedimientos de fusión lumbar.
- Por último se ha detectado un leve incremento en la incidencia de cáncer en relación con la aplicación de rh-BMP-2.

En nuestro ensayo no hemos encontrado fenómeno alguno de inflamación en el grupo DBX o Colloss, ambos matrices óseas desmineralizadas. Los resultados en términos de regeneración han sido satisfactorios en las comparaciones intergrupales a favor de DBX, pero en términos absolutos no son especialmente llamativos. Es decir, en ningún caso se han producido fenómenos de osificación heterotópica y de media, incluso en los especímenes en los que se había producido mayor regeneración, el volumen de hueso neoformado, en ningún caso sobrepasaba o se igualaba al del hueso nativo.

Así, el rango de regeneración ósea, expresado como volumen de tejido óseo neoformado, en el grupo DBX alcanzó cifras de 9 a 11mm³. Como referencia para valorar esta capacidad regenerativa, el volumen teórico de hueso neoformado era de 15 a 16 mm³, que correspondería con el volumen del defecto inicial de la craneotomía. Como analizaremos en más detalle posteriormente, las propias técnicas de medición, a

resultas de los fenómenos de contracción y descalcificación, como consecuencia de la metodología de preparación de muestras para su análisis histológico, pueden infraestimar el volumen óseo regenerado. No obstante, no podemos considerar los resultados obtenidos como excepcionales.

Otra de las mayores controversias respecto a la utilización de matrices óseas desmineralizadas es la gran disparidad de resultados tal y como señalan Lee¹⁸¹ y Lin²⁶³. En gran medida, tal y como se comentó en el apartado de Introducción, la teórica variabilidad del potencial osteoinductivo de estas matrices se relacionaría con la dosificación de BMP y otros factores de crecimiento presentes en las mismas y que es inherente al procesado y fabricación de las matrices. Esto es especialmente significativo en relación con aquellos productos obtenidos a partir de donantes humanos, tales como DBX, en los que teóricamente, la edad, género del donante y capacidad osteogénica intrínseca del mismo puede relacionarse con el nivel de dosificación de BMP presente en la matriz ósea desmineralizada, obtenida a partir de los mismos.

Una vez más, lo que no es novedad en la literatura científica concerniente a las matrices óseas desmineralizadas, encontramos gran disparidad de resultados. Wang¹⁶⁹ constata una variabilidad de la dosificación de BMPs entre diferentes lotes de producto. En esta línea Bae et al¹⁷¹, estudiaron 10 lotes diferentes de InterGro DBM Putty y detectaron diferencias estadísticamente significativas, no sólo en la cuantificación de BMP sino también en su desempeño *in vivo* en un modelo de fusión espinal de rata atómica. Como contraposición, Trainor et al¹⁷⁴, consideran que dichas diferencias no son relevantes clínicamente en términos de capacidad osteoinductiva.

Synthes, compañía manufacturera de DBX® refleja que la cantidad media de BMP-2 es de alrededor de 3,8 picogramos/gramo de DBX® y destacan la presencia de valores elevados de FGF- α y TGF- β 1 en comparación con otros preparados de DBM

comercialmente disponibles. Estos datos son congruentes con aquéllos publicados por Wieldeman et al¹⁷⁵.

Dados los antecedentes, quisimos valorar esta circunstancia mediante la utilización de dos lotes diferentes en el grupo DBX y en el grupo Colloss. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en términos de potencial regenerativo por el hecho de utilizar un lote u otro aunque el bajo número de sujetos (n=5) podría haber provocado que no se hubiesen detectado diferencias a pesar de existir.

Debemos por tanto, interpretar los resultados obtenidos con matrices óseas desmineralizadas con suma cautela, dado el rango amplio de resultados obtenidos con su utilización que incluye estudios con resultados positivos en términos de regeneración, remodelación ósea y resistencia a la tracción, hasta estudios sin efectos destacables. Estamos lejos todavía de determinar la cantidad de BMP ideal, el *carrier* más apropiado y sobre todo la consistencia de los resultados que permitan una aplicación reglada y sistematizada de las mismas. No hay que olvidar, que dado el enorme coste monetario resultante de la utilización de estos productos y al posible riesgo de transmisión de enfermedades priónicas, VIH, etc., es prioritario garantizar que al menos los productos disponibles para clínica humana acrediten un nivel más que satisfactorio de potencial osteoinductivo, al menos en tests con animales.

2.2 COLLOSS-E®

Si revisamos la literatura científica de los últimos 15 años, a pesar del enorme volumen de publicaciones relacionadas con la utilización de Matriz ósea desmineralizada, apenas podemos encontrar diecinueve referencias sobre la utilización de Colloss-E® en procedimientos experimentales, y de ellas, apenas tres, son estudios

en modelos experimentales de tamaño crítico. Sorprende una vez más, como un producto con un background científico tan pobre, puede estar aprobado por la FDA, via dispositivo médico para su utilización directa en humanos.

Los pobres resultados obtenidos con Colloss-E[®] en el presente proyecto de Tesis Doctoral, están en consonancia con aquellos obtenidos en los escasos estudios de relevancia publicados. Así, Nienjhuis et al²⁶⁷, mostraban su sorpresa al constatar que no sólo Colloss-E[®], no solo no inducía significativamente la regeneración ósea en un modelo de defecto de tamaño crítico de mandíbula de cabra sino que incluso el grupo Control era superior. Fassbender et al, obtienen resultados similares al comparar un Aloinjerto frente a Collos-E^{®183}. Hay varias posibles explicaciones a estos resultados. En primer lugar, la consistencia algodonosa del material hace que sea difícil de manejar y al mismo tiempo la propia compañía manufacturera aconseja no compactar excesivamente el material. Según la experiencia de este investigador, es francamente complicado determinar cuál es la cantidad exacta de material y el grado de compactación ideal a aplicar en un defecto segmentario, prácticamente plano como el de la craneotomía de rata. Probablemente, la utilización de Colloss-E[®] en combinación con algún biomaterial de mayor integridad estructural pueda soslayar estos defectos y permitir así obtener mejores resultados tal y como sugieren Jensen et al²⁶⁸, mediante la utilización de *carriers* de colágeno y carboximetil-celulosa. Otra alternativa es us utilización únicamente en defectos cavitarios con la suficiente integridad estructural para evitar dicha compactación¹⁸⁸. En estas situaciones parecen obtenerse resultados satisfactorios, aunque por otro lado, si el defecto óseo es lo suficientemente estable desde un punto de vista estructural (defectos de una o dos paredes), es probable que el impulso osteogénico del Collos-E[®] sea más bien marginal y que por tanto la regeneración del defecto se deba a la capacidad intrínseca del hueso de restaurar estos defectos.

Otro de los factores que podrían justificar los resultados se relaciona con la cantidad absoluta de BMPs presente en la formulación comercial de Collos-E[®]. Como señalábamos anteriormente, la cantidad de BMPs, presente en los compuestos de Matriz Ósea Desmineralizada se relaciona directamente con u potencial osteoinductiva. En este sentido, no hemos conseguido obtener información relevante alguna sobre la cuantificación de BMP presentes de Colloss-E[®].

Podemos concluir por tanto, que en las circunstancias actuales no existe suficiente base científica que apoye el uso de Colloss-E[®] en procedimientos de regeneración ósea en humanos.

2.3 BIO-OSS

Aparentemente, en el grupo Bio-Oss el hueso regenera centripetamente desde los bordes del defecto de forma similar al grupo Control. No se ha evidenciado ningún caso de puenteado completo del defecto y como mucho se evidencia la existencia de una fina lámina de hueso en la zona dural, que como decimos, en ningún caso puentea por completo el defecto. Destaca por tanto que solamente en los bordes del defecto puede detectarse hueso regenerado, en estrecho contacto con partículas de Bio-Oss remanentes. Para considerar su efecto osteoconductor, las partículas de Bio-Oss deberían estar en su mayor parte osteointegradas tal y como señala Hoecker²⁶⁹ con un 88% de osteointegración de las partículas a 8 semanas. Nuestros datos son, por el contrario equivalentes a los obtenidos por Young²⁷⁰, en los que se demuestran una ausencia de osteointegración de las partículas, estando éstas rodeadas por un tracto fibroso en las porciones más centrales del defecto. Podemos considerar que el teórico efecto

osteoconductor del Bio-Oss es insuficiente para promover una adecuada regeneración ósea en defectos de tamaño crítico de cráneo de rata.

Estos hallazgos son consistentes con los realizados por Su-Gwan²⁷¹, también en un modelo de tamaño crítico de cráneo rata. Por el contrario, Hockers et al²⁷², detectaron niveles elevados de regeneración ósea centripeta y centrífuga en un modelo de defecto de tamaño crítico de radio de conejo. No hay que olvidar en este punto, que el potencial osteo-regenerativo del conejo es incluso mayor que el de la rata y que por tanto estos dos datos no son directamente equiparables a los obtenidos en nuestro experimento. Por otro lado, como posteriormente analizaremos en detalle, la técnica de evaluación del hueso regenerado puede también influir en los resultados obtenidos.

Otro de los factores a valorar con el empleo de Bio-Oss es el grado de reabsorción de las partículas. Parece lógico pensar que si no se ha producido la osteointegración de las partículas, tampoco se han producido fenómenos de remodelación y por tanto de reabsorción osteoclástica. Estos datos concuerdan con los obtenidos por Young²⁷⁰, Park²⁷³ y Kim²⁷⁴ (no osteointegración, no reabsorción) en contraposición con Hockers²⁷² (gran osteointegración, ausencia de reabsorción) y Klinge (reabsorción total de Bio-Oss a 14 semanas). Esta enorme disparidad de resultados, no permite por tanto discernir el verdadero mecanismo de reabsorción del Bio-Oss y extrapolar por tanto los datos obtenidos en nuestro modelo experimental.

A tenor de los resultados obtenidos, parece que Bio-Oss tiene un comportamiento notablemente diferente en función de la localización donde se aplique así como por la adición o no de hueso autólogo o matrices desmineralizadas^{276,277}. Así, parece que los resultados obtenidos en humanos en la localización del seno maxilar son muy superiores a otras localizaciones como el esqueleto apendicular, incluso en comparación con matrices óseas desmineralizadas, tal y como refieren Wu²⁷⁸ y Jensen²⁷⁹. Así en seno

maxilar, se considera que la aplicación de un mayor porcentaje de Bio-Oss en la mezcla del material de relleno en el seno maxilar, es netamente superior en términos de supervivencia a largo plazo de implantes dentales, frente a los pobres resultados obtenidos en otras localizaciones²⁸⁰. En concreto, los peores resultados se relacionan con tasas nulas o prácticamente nulas de reabsorción e integración de las partículas en el hueso regenerado. Estos resultados concuerdan con los principios básicos de la regeneración y remodelación ósea a partir del concepto de la BMU o cámara de remodelación, de tal forma que para alcanzar los mejores resultados en términos de regeneración ósea, es fundamental que además del desarrollo de un frente de reosificación, que se produzca una remodelación posterior del hueso neoformado.

Finalmente, otro de los factores esgrimidos a favor de la utilización de biomateriales desproteinizados en regeneración ósea es su teórica mayor seguridad para el paciente. Así, según refieren las compañías manufactureras, los procesos de desorganificación que se llevan a cabo en la purificación y desarrollo del Bio-Oss, por poner un ejemplo, eliminan la totalidad de proteínas con un riesgo casi nulo de transmisión priónica o vírica convencional (VIH, VHB, VHC, etc.). No obstante, Kim et al²⁸¹ en una revisión sistemática de artículos relacionados con este concepto afirma que se han detectado trazas de proteínas en lotes de producto Bio-Oss® y Tutoplast® y que existen discrepancias respecto a la detección de partículas priónicas en muestras de médula ósea bovina y su capacidad infectiva. Creemos por tanto, que es preciso considerar estos factores y no utilizar dichos biomateriales a la ligera. En cualquier caso, el paciente debería ser consciente del riesgo teórico al que se enfrenta y por supuesto, con el enorme volumen de biomateriales de este tipo que se comercializan, es mandatorio, realizar un seguimiento controlado sobre posibles contagios o desarrollo de patología priónica.

A pesar de ello, Bio-Oss® sigue considerándose un biomaterial excelente que aporta

estabilidad estructural a los injertos y se considera hoy en día el *gold standard* en procedimientos de elevación de seno para implantología dental. No obstante, debe tenerse en cuenta su efecto predominantemente estructural y estabilizador más que su efecto osteoconductor y osteoinductor. Recomendamos en situaciones de elevada demanda regenerativa combinar Bio-Oss® con partículas de hueso autólogo. La combinación de Bio-Oss® con materiales osteoinductores como la DBM también es prometedora²⁷⁹, pero son necesarios más estudios en condiciones estandarizadas para poder perfilar la mejor combinación posible de ambos grupos de materiales.

3. ELECCIÓN DE LA TÉCNICA DE EVALUACIÓN

3.1 TÉCNICA RADIOLÓGICA

Como ya hemos comentado anteriormente, numerosos estudios han evaluado la regeneración ósea en defectos de tamaño crítico de cráneo de rata⁶. En aquellos en los que se utilizaron técnicas de imagen, el método utilizado fue en su mayor parte con técnicas planimétricas que evaluaban en dos dimensiones la morfología y la gradación de grises para extrapolar con estos datos la densidad y en cierta medida la regeneración ósea producida¹⁴⁶. Desde un punto de vista objetivo, estas técnicas son cuanto menos parciales e incompletas puesto que no evalúan el defecto desde un punto de vista tridimensional. Por otro lado el grado de precisión y definición que se obtiene con la radiología convencional es notablemente inferior al que se obtiene con los sistemas de tomografía radiológica.

Como ya explicamos en el apartado de Introducción, la principal ventaja de los sistemas tomográficos es la capacidad de integrar la información recogida en los sistemas de

detección radiológica de forma que a partir de múltiples cortes del objeto a estudiar y mediante la utilización de complejos algoritmos matemáticos, es posible integrar dicha información y reconstruir tridimensionalmente la imagen radiológica de dicho objeto. Es decir, en lugar de trabajar sobre unidades en dos dimensiones o píxeles se trabaja con unidades tridimensionales o voxel.

Dentro de los sistemas de tomografía radiológica, podemos distinguir tres variantes aplicables a la investigación en modelos experimentales de regeneración ósea: micro-Tomografía Computerizada (μ -CT), Tomografía Convencional Multidetector (MDCT) y Tomografía de haz cónico.

La tomografía computarizada por haz cónico (CBCT) ha sido la técnica de imagen elegida en este estudio para valorar el volumen óseo del tejido óseo regenerado a partir de los defectos de tamaño crítico. El CBCT nos permite obtener imágenes mucho más detalladas que las obtenidas con radiografía convencional discriminando con muchísimo más detalle las densidades radiológicas de los diferentes tejidos del organismo^{282,283}.

En comparación con los sistemas de TC multidetector (MDCT) y cone-beam (CBCT), los sistemas de micro-CT (*ex vivo*) tienen una resolución espacial considerablemente más alta, del orden de treinta veces más y se consideran el *gold standard* para el estudio de la estructura ósea en un nivel supracelular^{284,285,286}.

Los sistemas de micro-CT, *aplicados ex vivo*, permiten determinar con gran precisión, la arquitectura 3D del hueso así como los parámetros de calidad y cantidad de tejido óseo. Como principal inconveniente destacaríamos que es una técnica relativamente costosa y sólo permite el estudio una vez finalizado el ensayo, sin fases intermedias²⁸⁴. La utilización *in vivo* de los sistemas de micro-CT, permite también realizar mediciones longitudinales, pero para ello, se deben utilizar protocolos de escaneo rápido con baja radiación, que disminuyen notablemente la resolución de los estudios²⁸⁶.

Por otro lado, los sistemas de TAC multidetector (MDCT) han avanzado significativamente, hasta tal punto que es factible alcanzar resoluciones de 250 μm o 100 μm isotrópicos en el caso de los CBCT (en comparación con las 10 μm de los sistemas de micro-CT) con la ventaja de su mayor accesibilidad y su capacidad de visualizar estructuras trabeculares humanas²⁸⁵.

Dado que el hueso craneal de rata prácticamente carece de estructuras trabeculares y a que ya se contaba con un método de alta resolución de referencia, como era el método Estereológico, unido a la dificultad de acceder a un sistema de micro-CT o de TAC Multidetector, se decidió utilizar como alternativa un sistemas de CBCT (Centro ICAT) accesible por el experimentador.

Los sistemas de CBCT, por su parte, aunque tienen menor resolución que los MDCT, tienen la ventaja de su mayor accesibilidad (disponibles ya en un gran número de Consultas Dentales) y su menor radiación, lo que los hace ideales para estudios *in vivo*²⁵⁶. Como comentamos en el apartado de Introducción, la CBCT reconstruye directamente volúmenes mediante cálculo informático a partir de varias proyecciones bidimensionales multiangulares del objeto de estudio, para posteriormente obtener mediante procesamiento secciones en los tres planos del espacio²⁵⁴. Esto es una diferencia fundamental con la TC multicorte, en la que se obtienen inicialmente los cortes axiales secuenciales y posteriormente se pueden reconstruir volúmenes. Otra diferencia importante radica en que en la CBCT el vóxel obtenido es cúbico (denominado isométrico o isotrópico) y en la CT tradicional tiene forma de paralelepípedo rectángulo (anisométrico o anisotrópico), lo que le confiere teóricamente una superioridad en cuanto a la fidelidad dimensional del volumen anatómico estudiado^{254, 286}.

De todos los parámetros de medición para estudios radiológicos sobre regeneración ósea,

el volumen óseo (BV) es el más utilizado. La elección del sistema de CBCT, parecía por tanto la más adecuada para valorar el volumen óseo del hueso regenerado en la craneectomía de tamaño crítico. Además al contar con la referencia de la estimación volumétrica del análisis esterológico, otro de los objetivos del presente proyecto de Tesis Doctoral, era precisamente, determinar si los resultados obtenidos en términos de volumen óseo regenerado, obtenidos a partir de una técnica histológica como el método de Cavalieri eran comparables a los obtenidos utilizando el BV a partir de los estudios de CBCT. El principal interés para realizar esta correlación, es la de considerar la posibilidad de utilizar uno u otro sistema de evaluación indistintamente, en función del tipo de estudio que planteamos realizar.

Se eligió como parámetro de medición el volumen óseo regenerado por tres motivos. En primer lugar, porque tal y como hemos señalado anteriormente, en la actualidad constituye el parámetro de referencia en el análisis radiológico de estudios de regeneración ósea. En segundo lugar, porque el método de validación histológico utilizaba la misma variable. Finalmente, y tal y como vimos en el apartado de Introducción, los sistemas de CBCT todavía no ofrecen un rendimiento óptimo en términos de valoración de densidades, toda vez que sus algoritmos matemáticos no permiten por el momento una equiparación directa de los valores obtenidos con la escala de grises de los sistemas de CBCT y las unidades Hounsfield de los sistemas de TAC multicorte (que son la referencia)^{250,251,252}.

A la vista de los resultados obtenidos, hemos podido constatar que el BV determinado con CBCT era en términos absolutos mayor que el volumen óseo determinado con el Método de Cavalieri (en términos globales un 14% superior con $p < 0,05$).

Esta sobreestimación se atribuye en gran medida a la menor resolución de los sistemas de CBCT por el tamaño de sus Voxel, en comparación con los sistemas de micro-CT o

de Cavalieri que permiten una mayor resolución en el plano microscópico. Debido a los algoritmos de cálculo de volumen, los sistemas informáticos de los sistemas CBCT determinan que si un determinado voxel está relleno en al menos un 50% , se cuentan como hueso (**Figura 102 (azul o rojo)**) mientras aquellos que no están rellenos al menos en un 50%, no se cuentan (**Figura 102 (blanco)**). En este sentido, como los sistemas de CBCT, tienen menor resolución que los de micro-CT y que la propia medición con el sistema de cuadrículas del Método de Cavalieri, generan un volumen óseo que es mayor que la cantidad real de hueso regenerado.

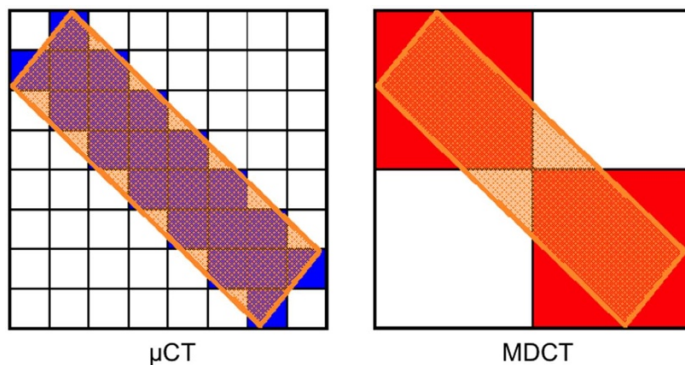


Fig 102. Representación esquemática de la diferente resolución por el tamaño de los voxel en los sistemas de micro-CT vs TC. Adaptado de: Bissinger O. *Micro-CT vs Whole Body Multirow Detector CT for Analysing Bone Regeneration in an Animal Model*. PloS ONE 2016; 11 (11): e0166540.

Por otro lado, en el análisis radiológico, es el experimentador el que debe delimitar los ROI con los que posteriormente calcular el volumen del mismo. A pesar de las potentes herramientas del sistema informático de procesamiento de imágenes Osirix, entre las que se incluye las mencionadas en aparatos anteriores 3D-MPR con filtros CLUT, apenas se realizan tres señalizaciones de ROI. Es decir, en contraposición al “do more less well” del sistema de Cavalieri aquí habría que decir “do less much much well”. O lo que es lo mismo, al ser tan pocas mediciones la posibilidad de cometer un error es mayor. Especialmente difícil fue la medición del volumen de hueso regenerado en los casos en que se puentaba por completo la craniectomía. Una solución para este problema, podría

haber sido utilizando un mayor número de observadores que determinaran la medición de los ROIs y posteriormente calcular el coeficiente de variación interobservador.

En este sentido, seguimos considerando como *gold standard*, el método estereológico. No sólo aporta una medición cualitativa de los fenómenos histológicos implicados en el proceso regenerativo sino que además aporta una medición mucho más precisa del volumen óseo regenerado. Dado que ya contábamos con un método exacto de medición, se decidió valorar las características de la medición del sistema de CBCT en condiciones estándar con el fin de calibrar su verdadera funcionalidad.

Además, de forma consciente, se decidió incluir como grupo comparativo a los grupos experimentales DBX y Colloss (que por su desmineralización son esencialmente poco radiodensos) el Bio-Oss, que como ya hemos comentado en sucesivas ocasiones es muy radiodenso. Así, si bien el análisis histológico, se pudo determinar con precisión el volumen de hueso regenerado con diferencias significativas únicamente a favor del grupo DBX ($p < 0,05$) y el volumen de biomaterial remanente, dicha distinción no fue posible realizarla con el sistema de CBCT, que además de sobreestimar en términos generales al menos un 14% el volumen de hueso regenerado, en el caso concreto del Bio-Oss esta sobreestimación alcanzaba casi el 50%. Tal es así, que al analizar los datos de regeneración ósea obtenidos con la medición de CBCT, los resultados de Bio-Oss se equiparan a los obtenidos con DBX, demostrando, erróneamente diferencias significativas respecto a los grupos Control y Colloss .

Una posible solución a este problema hubiera sido utilizar como un fantoma de referencia de Bio-Oss que pudiese calibrar adecuadamente el sistema de CBCT. A partir de ahí se podría haber calculado la densidad media de los ROI y extrapolar posteriormente los datos a una media de densidades. No obstante, como señalamos anteriormente, el punto fuerte de los CBCT, no es la medición de densidades (para ello es preferible utilizar los sistemas

de multicorte o micro-CT) sino que por la morfología de su voxel, como decíamos anteriormente, es preferible la medición de volúmenes.

El efecto de sobreestimación, queda patente en los resultados obtenidos y señala una vez más la importancia de seleccionar adecuadamente el método experimental a emplear en función del biomaterial que se vaya a utilizar.

No obstante y a pesar de los factores anteriormente comentados, sí se constató una fuerte correlación entre la Técnica de Cavalieri y CBCT, en los grupos Control, DBX y Colloss, debido a que el sesgo de medición es corregible con la ecuación de regresión. En este sentido, Thomsen et al²⁸⁸ ya determinaron una adecuada correlación en la determinación de BV con técnicas radiológicas de micro-CT y Estereológicas.

Otra de las consideraciones sobre los sistemas de CBCT es su rápido tiempo de escaneo en comparación con los sistemas de micro-CT. Esto es de vital importancia en aquellos diseños experimentales en los que sea preciso realizar diferentes mediciones longitudinales a lo largo del procedimiento, en los que es preciso que el animal, por motivos evidentes, permanezca vivo, para poder valorar la evolución del proceso de regeneración, por poner un ejemplo. Por otro lado, los sistemas de micro-CT *in vivo* presentan dosis de radiación que oscilan entre 272 a 1.088 mGy, dependiendo de la resolución y se considera que la dosis máxima debe ser inferior a 500 mGy para medidas longitudinales prospectivas. En este sentido, los sistemas de CBCT y MDCT, presentan dosis de irradiación en torno a 25 mGy, lo que teóricamente los señala como los métodos radiológicos ideales para la evaluación *in vivo*, en términos de menor irradiación al sujeto experimental.

Podemos concluir por tanto que:

1. Los sistemas de CBCT permiten realizar un adecuado procesamiento radiológico de las muestras de craneotomía de rata con posibilidad de realizar escaneos simultáneos con el consiguiente ahorro en tiempo y dinero.
2. El programa informático de análisis radiológico Osirix® permite realizar satisfactoriamente un post-procesado de las imágenes en formato DICOM obtenidas en el CBCT en secuencias 2D y 3D.
3. Los sistemas de CBCT permiten cuantificar el volumen óseo regenerado (BV), en términos de tejido calcificado (TMD) formado y la relación entre el tejido calcificado y el volumen tisular (TMD/BV), pero todavía están lejos de informar sobre la verdadera microestructura formada del hueso regenerado, densidad celular, reacciones inflamatorias, etc.
4. Si se plantea la utilización de los sistemas de CBCT es conveniente tener en cuenta, a la hora de evaluar el volumen óseo regenerado, el biomaterial utilizado. Así, si se utilizan, como en el presente proyecto, matriz ósea desmineralizada, el volumen óseo y el tejido mineral resultante, medible con CBCT será extrapolable siempre y cuando no se hayan introducido otros biomateriales (por ejemplo Bio-Oss o Apatitas Coralinas) que debido a sus características pueden sobreestimar el efecto regenerativo.

3.2. TÉCNICA HISTOLÓGICA

El principal inconveniente de las técnicas histológicas es, como ya hemos señalado en diferentes ocasiones, que precisa en la gran mayoría de las ocasiones del sacrificio del animal de experimentación. En los modelos experimentales de craneotomía de rata, no es factible, por su complejidad técnica la realización de biopsias durante el procedimiento⁶. Por el contrario, para el análisis histológico de las muestras es preciso

el sacrificio del animal. En nuestro modelo experimental esto no supuso un problema por cuanto que pretendíamos establecer la capacidad final de osteoinducción de las matrices testadas. En un modelo con biopsias intermedias, el efecto de regeneración ósea en cascada inducido por las matrices desmineralizadas se podría desvirtuar, además de la posible contaminación, infección o disgregación de los biomateriales a testar.

Con el fin de evaluar, mediante técnicas histológicas el patrón de crecimiento, es preciso utilizar marcadores de aposición ósea como la tetraciclina, hematoporfirina o el naranja xilenol²⁸⁹. No obstante, dichas técnicas son incompatibles con las técnicas de descalcificación utilizadas en este modelo de análisis, por lo que su utilización también hubiera sido muy restringida.

En este sentido, en aquellos estudios en los que se pretenda evaluar puntos intermedios de regeneración pueden ser de utilidad las técnicas radiológicas con CBCT anteriormente mencionadas, que permiten evaluar el proceso regenerativo *in vivo* y con baja radiación para el animal de experimentación. Una alternativa también prometedora es la utilización de estudios con PET –TAC que permiten evaluar el estado metabólico del proceso regenerativo²⁴².

3.2.1 Procesado de las muestras

En cuanto al procesado de las muestras, debemos señalar varios aspectos. Tal y como se describió en el apartado de Material y Método, fue preciso descalcificar las muestras e incluirlas en parafina para su posterior manejo. El hecho de utilizar el método estereológico, condiciona que deben realizarse múltiples cortes histológicos de unos 5 µm de grosor, para posteriormente ir seleccionando, según la metodología anteriormente descrita, cortes al azar para su muestreo con el recuento de puntos^{236,237}.

El hecho de descalcificar las muestras implica por ejemplo que no se puede efectuar la tinción de tricrómico de Goldner que permite diferenciar de forma precisa el osteoide no mineralizado del hueso mineralizado²³³. En nuestro procedimiento experimental, ello no ha supuesto inconveniente alguno. A la hora de evaluar las muestras histológicas con tinción de H-E y tricrómico de Masson, no encontramos grandes dificultades para diferenciar ambos tejidos, al igual que se pudo evidenciar con claridad el frente de osificación por la presencia de un artefacto de las preparaciones que delimitaba con claridad el inicio del frente de osificación, en concordancia con los hallazgos obtenidos por Bosch. Sí es destacable que la tinción de Tricrómico de Masson permitió definir con mayor nitidez la disposición y orientación de las fibillas óseas del tejido regenerado²³³.

El método de inclusión con parafina, produce en ocasiones retracciones de los tejidos con plegamiento de los tejidos blandos. En las muestras analizadas, estos fenómenos han sido muy limitados. En cualquier caso se asumió que dichos fenómenos afectarían a todas las muestras de una forma equivalente y que por tanto no desvirtuaban el análisis histológico. Por otro lado, como el análisis estereológico se centró en el análisis cuantitativo del volumen óseo regenerado en el defecto de tamaño crítico, la presencia de fenómenos marginales de retracción de los tejidos blandos, no interfirió en el procedimiento de conteo de impactos con el método de rejilla.

3.2.2 Estudio Estereológico

A la hora de realizar el método de conteo con la retícula de puntos, el primer hallazgo que se evidenció, fue la clara delimitación del inicio del frente de osificación respecto al límite de la craneotomía inicial, de acuerdo con los resultados descritos por Bosch⁹⁵. Dicho límite se podía evidenciar en la mayor parte de las ocasiones por la presencia de un artefacto de retracción. En aquellos casos con en los que el límite era más difuso, el

análisis de los cristales al microscopio, permitía completar la señalización del contorno de la craneotomía con precisión.

Se ha podido comprobar la facilidad de utilización del método de recuento de puntos. A su favor tiene el escaso “hardware” necesario, con una lupa microscópica que proyecta la preparación histológica sobre una hoja impresa de papel con una retícula de puntos definida. La medición de las muestras de cada animal oscilaba entre los 15 a 20 minutos, contando la totalidad de impactos en las diferentes secciones de las muestras histológicas seleccionadas.

Al realizar un muestreo sistemático al azar de la estructura, tal y como se describió en el apartado de Introducción, se pueden lograr coeficientes de error en la mayoría de los casos por debajo del 10%. En nuestro procedimiento, se obtuvieron CE por debajo del 10% en todos los grupos experimentales con contajes de impactos de 50 a 200 en 5 a 10 secciones por cada animal. Ello permitió proceder con el análisis estadístico intergrupal, al aceptar que la variabilidad atribuible al proceso de contaje estaba en rango con un $CE^2 < CV^2$ ²³⁷.

La alternativa al método de contaje de puntos manual con rejilla, son los métodos computerizados, donde la imagen de la preparación histológica se escanea o se procesa directamente en el caso de utilizar un sistema digital de microfotografía y a partir de ahí se procesa utilizando un sistema informático apropiado. En primer lugar, y por razones obvias al no disponer de dicho sistema informático, no fue posible realizarlo. Más allá de eso, en ocasiones las diferentes técnicas (análisis de histogramas o volumetría digital) no aportan un extra de precisión y sí mayor rapidez en el proceso de medición. Una alternativa intermedia, es el sistema de medición de puntos con rejilla computerizado que permite aunar la precisión de los sistemas digitales con el recuento realizado por el investigador asistido por el sistema digital. Gracias a ellos la precisión puede alcanzar

valores inferiores al 2%. El principal inconveniente de este sistema es el gran coste de los sistemas digitales²³⁸.

Precisamente, éste fue uno de los puntos a valorar cuando se realizó el diseño del modelo experimental al introducir un sistema de medición digital (a través del análisis radiológico) con un coste razonable y con un sistema de procesamiento informático (Osirix) accesible para cualquier investigador. Así, se quiso valorar la posible equiparación de ambas técnicas de medición: digital-radiológica y analógica-estereológica.

Como ya comentamos en el apartado anterior, el sistema de medición con CBCT no alcanza la precisión obtenida con el análisis estereológico, especialmente cuando se utilizan biomateriales con una elevada radiodensidad en su composición. Así, en el grupo Bio-Oss, el análisis estereológico permitió determinar con claridad y precisión, que el volumen real de tejido óseo regenerado era notablemente inferior al estimado por el método radiológico. Esto es así porque las partículas del mismo, se evaluaban como hueso regenerado, a pesar de ser en realidad partículas, en cierto modo inertes. Como alternativa, la utilización de los sistemas de PET-TAC pueden aportar el complemento para la valoración de la actividad metabólica de ese supuesto tejido regenerado. Lamentablemente el enorme coste y dificultad de acceso a estas técnicas de medicina nuclear, restringe notablemente su utilización en experimentación básica en animales.

Por otro lado, el análisis histológico, ha permitido además definir las características del tejido regenerado. Así, por ejemplo en el grupo DBX, el hueso regenerado era en términos generales, similar en grosor y estructura al hueso nativo, con un predominio, eso sí del tejido inmaduro. Llama la atención, la existencia en algunos especímenes de fenómenos de remodelación y sistemas de Havers, a pesar de que tradicionalmente se describe la anatomía ósea del cráneo de rata como carente de los mismos⁵⁵. La explicación probable, está en relación con el fenómeno regenerativo en cascada inducido

por la matriz ósea desmineralizada que desencadena el conjunto de procesos osteoformadores, desde la inducción hasta la remodelación del tejido óseo⁶⁶. Se plantea por tanto la duda sobre si dicho tejido se puede considerar una verdadera osificación heterotópica o es en realidad una modificación de la estructura ósea de la rata¹²⁰. Son necesarios sucesivos experimentos para confirmar este punto.

Como comentamos anteriormente, el análisis esterológico se basa en la capacidad de calcular el volumen de una estructura determinada, utilizando técnicas de muestreo sistemático al azar y luego aplicando sobre los datos obtenidos una serie de fórmulas matemáticas. Es este primer punto del muestreo sistemático, el fundamental a la hora de considerar la validez de los resultados obtenidos. Para ello, se confirmó la validez de escoger cortes histológicos seleccionados al azar, de forma sistemática para su posterior análisis.

La escasa utilización del método estereológico para la medición de volumen óseo en defectos craneales de tamaño crítico planteaba la dificultad de considerar el método esterológico como la referencia en precisión frente a otros métodos histomorfométricos. En este sentido, tal y como refieren Arias²³⁸, Pallesen²⁸⁷, y fundamentalmente Thomsen²⁸⁸, que incluso compara el análisis estereológico con los sistemas de micro-CT, el método estereológico es perfectamente adaptable para la medición de volumen de tejido óseo regenerado en defectos de tamaño crítico.

Como decimos, uno de los objetivos del procedimiento experimental era la medición del volumen óseo regenerado para así comparar con los resultados obtenidos por el método radiológico. La principal ventaja del análisis estereológico es que permite calcular volúmenes de estructuras biológicas con gran precisión y esto es gracias a su metodología de muestreo. Así, en los métodos planimétricos clásicos de la histomorfometría, a partir de imágenes histológicas seleccionadas de la porción más

central del defecto se realiza una interpolación del volumen mediante un sistema informático²⁸⁹. El principal inconveniente que tiene este método es la posible introducción de sesgos al utilizar una cantidad limitada de cortes histológicos. Por otro lado, cuando los objetos no son isotrópicos, tal y como sucede en el tejido regenerado en una craneotomía, la única forma de asegurarse que las secciones utilizadas para calcular el volumen real del objeto representan la totalidad del mismo, es realizar un muestreo sistemático al azar para obtener diferentes secciones del objeto²³⁶.

En nuestro procedimiento, comprobamos que efectivamente el análisis estereológico permitía discriminar correctamente el volumen óseo regenerado en los diferentes compartimentos y que dicho volumen, guardaba relación con los hallazgos complementarios obtenidos tanto a partir del estudio cualitativo de las muestras histológicas como de aquéllos obtenidos con el análisis radiológico (con las salvedades anteriormente expuestas de sobreestimación de los resultados del grupo Bio-Oss).

Otro de los aspectos a valorar es la posible infraestimación del volumen óseo regenerado con el método de Cavalieri. Desde un punto de vista matemático, el teórico volumen máximo del tejido regenerado podría ser de unos 15,9-15,7 mm³ de hueso. Esto es así, porque como ya describimos anteriormente, dicho volumen, corresponde al equivalente geométrico del defecto de la craneotomía de 5 mm de diámetro máximo y un grosor de 0,8 a 1 mm. Si bien es cierto, que a excepción del grupo de DBX, en ninguno de los otros grupos experimentales se produjeron fenómenos óseos regenerativos significativos, en ninguno de los especímenes de DBX se registraron volúmenes óseos próximos a 16 mm³, con un rango máximo de 11-12 mm³. Ello a pesar de una morfología histológica compatible con una regeneración ósea satisfactoria, con un puentado completo del defecto y un grosor equivalente al del hueso nativo en los límites de la craneotomía. Encontramos varias posibles explicaciones para ello.

En primer lugar, el efecto del procesado de la muestra al incluirlo en parafina, que determina una contracción tisular de al menos un 5%. Si a ello añadimos que la integridad estructural del hueso neoformado, con mayor porcentaje de osteoide no mineralizado, es significativamente menor al del hueso nativo, dicha contracción puede ser incluso superior, como demuestra la existencia de un artefacto de separación en el margen de inicio del frente de osificación. Por otro lado, durante la preparación de los cortes histológicos con el micrótomos semiatómico es inevitable que se produzca cierta dilatación por calentamiento. Finalmente, el hueso craneal contiene una cantidad variable de médula ósea que no es cuantificada como hueso en el recuento de puntos.

En cualquier caso, la infraestimación del volumen real probablemente es de escasa cuantía y en cualquier caso parece homogénea en los cuatro grupos experimentales con lo que la comparación del potencial de regeneración ósea intergrupos, sigue siendo válido. No obstante plantea la disyuntiva de cuál de los dos métodos de medición es el más preciso. O lo que es lo mismo, CBCT realmente sobreestima o es el Método Estereológico el que infraestima. Probablemente, la única forma sería comparar ambos métodos con un tercero de referencia y valorar cuál de ellos dos está más próximo al valor teóricamente real.

En términos generales, podemos concluir por tanto, que el método estereológico complementado con el análisis cualitativo de las muestras histológicas permite valorar adecuadamente el potencial regenerativo de las matrices óseas desmineralizadas. No obstante, son necesarios mayores estudios para estandarizar el método de recuento de puntos y poder comparar los resultados obtenidos con técnicas alternativas.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. El modelo experimental de craniectomía circular de 5 mm de diámetro en la rata, se ha mostrado eficaz para el estudio de la regeneración ósea y su potenciación con factores de crecimiento.
2. DBX®, matriz ósea desmineralizada de origen humano, ha demostrado inducir un aumento de la regeneración ósea de defectos craneales en su formulación *Putty* con *carrier* de Ácido Hialurónico al 93%
3. Colloss-E®, matriz ósea desmineralizada de origen equino no ha demostrado aumento alguno en la regeneración ósea.
4. DBX® y Colloss-E®, no han mostrado diferencias en su comportamiento osteogénico por el hecho de utilizar diferentes lotes de producto.
5. El hueso bovino desorganificado (Bio-Oss®) no ha mostrado efecto osteoconductor en los defectos craneales.
6. El análisis radiológico de la regeneración ósea con Tomografía de Haz Cónico, ha obtenido resultados prometedores, si bien todavía no equiparables a los obtenidos con el método estereológico.
7. La estereología ha demostrado ser un método efectivo y fiable para el estudio de la regeneración ósea de defectos craneales

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Finn Geneser: *Histología sobre bases moleculares*, 3ª edición. Barcelona. Ed Panamericana, 2000, pp 268-291
2. Marotti G. The structure of bone tissues and the cellular control of their deposition. *Ital J Anat Embryolo*. 1998;101:25-79.
3. Puzas, J. E. Osteoblast cell biology- Lineage and functions. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*, 11-15. 1996. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers.
4. Boskey A. Bone Composition: Relationship to bone fragility and osteoporotic drug effects. *Bonekey Reports* 2013; 2:447-62.
5. Kaufman MH. *The Atlas of Mouse Development*. Academic Press. Harcourt Brace and Company, Publishers. 1992; 495-497.
6. Nunamaker DM. Experimental models of fracture repair. *Clin Orthop*.1998;Supp:56-65
7. Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, et al. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol*. 1990; 143:420-430.
8. Boskey AL, Paschalis E. Matrix Proteins and Biomineralization, en *Bone Engineering*, Davies J.E. (ed). 1ª edición. Toronto. Ed em squared incorporated, 2000: 44-62.
9. Holick MF, Krane SM: Introduction to Bone and Mineral Metabolism, en Braunwald E., Fauci A.S., Kasper D.L., et al (eds): *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 15ª edición. New York. Ed Mc Graw-Hill, 2001: 2192-2195.
10. Lynch SE, Marx RE, Nevins M, Wisner-Lynch L. *Tissue Engineering. Application in Oral and Maxillofacial Surgery and Periodontics*, 2ª edición. Chicago, IL. Ed Quintessence Books, 2008.
11. Díaz EM, Guerrero R, De la Piedra C. Six osteocalcin assays compared. *Clin Chem*. 1994; 40:2071-2077.
12. Vuorio E, de Crombrughe B. The family of collagen genes. *Ann Rev Biochem*.1990; 59:837-872.
13. Smedsrod B, Melkko J, Risteli L, et al. Circulating Cterminal propeptide of type I procollagen is cleared mainly via the mannose receptor in liver endothelial cells. *J Biochem*. 1990; 271:345- 350.
14. Melkko J, Kauppila S, Niemi S, et al. J. Immunoassay for the intact aminoterminal propeptide of human type I procollagen (PINP). *Clin Chem* 1996; 42:947-954.
15. Noble BS, Peet N, Stevens HY, Brabbs A, et al. Mechanical loading: biphasic osteocyte survival and targetting of osteoclasts for bone destruction in rat cortical bone. *Am J Physiol Cell Physiol*.2003; 284: 934-943.

16. **Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair—current views. *Stem Cells*. 2007; 25:2896-2902.**
17. **Guo Z, Li H, Li X, Yu X, et al. In vitro characteristics and in vivo immunosuppressive activity of compact bone-derived murine mesenchymal progenitor cells. *Stem Cells*. 2006; 24:992-1000.**
18. **Bianco P, Kuznetsov SA, Riminucci M, Gehron Robey P. Postnatal skeletal stem cells. *Methods Enzymol*. 2006; 419:117-148.**
19. **Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, et al. Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*. 1997; 89:755-764.**
20. **Komori T. Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *J Cell Biochem*. 2006; 99:1233-1239.**
21. **Friedenstein A.J. Osteogenic stem cells in the Bone marrow. EN “Bone and Mineral Research” (JNM Heersche y JA Kanis, eds.) Vol 7 243-270. Elsevier Science Publishers Biomedical Division. Amsterdam, 1990.**
22. **Kamioka H, Sugawara Y, Honjo T, Yamashiro T et al. Terminal differentiation of osteoblasts to osteocytes is accompanied by dramatic changes in the distribution of actin-binding proteins. *J Bone Miner Res*. 2004; 19:471-478.**
23. **Short B, Brouard N, Occhiodoro-Scott T, et al. Mesenchymal stem cells. *Arch Med Res*. 2003; 34: 565-571.**
24. **Otto F, Kanegane H, Mundlos S. Mutations in the RUNX2 gene in patients with cleidocranial dysplasia. *Hum Mutat*. 2002; 19: 209-216.**
25. **Zhang YW, Yasui N, Ito K, Huang G, et al. A RUNX2/PEBP2alpha A/CBFA1 mutation displaying impaired transactivation and Smad interaction in cleidocranial dysplasia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97:10549-10554.**
26. **Phimphilai M, Zhao Z, Boules H, Roca H, Franceschi RT. BMP signaling is required for RUNX2-dependent induction of the osteoblast phenotype. *J Bone Miner Res*. 2006; 21: 637-646.**
27. **Hinoi F, Bialek P, Chen YT, Rached MT, Groner Y, et al. Runx2 inhibits chondrocyte proliferation and hypertrophy through its expression in the perichondrium. *Genes Dev*. 2006, 20: 2937-2942.**
28. **Lee KS, Kim HJ, Li QL, Chi XZ, et al. Runx2 is a common target of transforming growth factor beta 1 and bone morphogenetic protein 2, and cooperation between Runx2 and Smad5 induces osteoblast-specific gene expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. *Mol Cell Biol*. 2000; 20: 8783-8792.**
29. **Bialek P, Kern B, Yang X, Schrock M. A twist code determines the onset of osteoblast differentiation. *Dev Cell*. 2004; 6: 423-435.**
30. **Jones DC, Wein M, Oukka M, Hofstaetter JG, et al. Regulation of adult bone mass by the zinc finger adapter protein Schurri-3. *Science*. 2006; 312:1223-1227.**

31. Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, et al. The novel zinc finger-containing transcription factor Osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*. 2002; 108:17-29.
32. Chan A, Van Bezooijen RL, Lowik CW. A new paradigm in the treatment of osteoporosis: Wnt pathway proteins and their antagonists. *Curr Opin Investig Drugs*. 2007; 8:293-298.
33. Zohar R, Cheifetz S, McCulloch CA, et al. Analysis of intracellular osteopontin as a marker of osteoblastic cell differentiation and mesenchymal cell migration. *Eur J Oral Sci*. 1998; 106 Suppl 1:401-407.
34. Parfitt AM. The cellular basis of bone turnover and bone loss. *Clin Orthoped Rel Res*. 1977; 127:236-247.
35. Veno P, Nicoletta DP, Sivakumar P, et al. Live imaging of osteocytes within their lacunae reveals cell body and dendrite motions. *J Bone Min Res*. 2006; 21(Suppl 1): S38..
36. Meyle J. RH 414. A new dye to stain non-decalcified bone tissue. *INT Post J Dent Oral Med*. 2001;3.
37. Imai S, Kaksonen M, Raulo E, et al. Osteoblast recruitment and bone formation enhanced by cell matrix-associated heparin-binding growth-associated molecule (HB-GAM). *J Cel Biol*. 1998; 143:1113-1128.
38. Martin RB. Does osteocyte formation cause the nonlinear refilling of osteons? *Bone*. 2000; 26:71-78.
39. Takagi M, Ono Y, Maeno M, Miyashita K, Omiya K. Immunohistochemical and biomechanical characterization of sulphated proteoglycans in embryonic chick bone. *J Nithon Univ Sch Dent*. 1997; 39:156-163.
40. Noble BS, Peet N, Stevens HY, Brabbs A, et al. Mechanical loading: biphasic osteocyte survival and targetting of osteoclasts for bone destruction in rat cortical bone. *Am J Physiol Cell Physiol* 284: 934-943, 2003.
41. Verborgt O, Gibson GJ, Schaffler MB. Loss of osteocyte integrity in association with microdamage and bone remodeling after fatigue in vivo. *J Bone Miner Res*. 2000; 15:60-67.
42. Hall BK, Miyake T. Divide, accumulate, differentiate: cell condensation in skeletal development revisited. *Int J Dev Biol*. 1995; 39:881-893.
43. Morris-Kay GM, Wilkie AO. Growth of the normal skull vault and its alteration in craniosynostosis: insights from human genetics and experimental studies. *J Anat*. 2005; 207:637-653.
44. Opperman LA. Cranial sutures as intramembranous bone growth sites. *Dev Dyn*. 2000; 219:472-485.
45. Iseki S, Wilkie AO, Morris-Kay GM. Fgfr1 and Fgfr2 have distinct differentiation- and proliferation-related roles in the developing mouse skull vault. *Development*. 1999; 126:5611-5620.
46. Ducy P, Schinke T, Karsenty G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science*. 2000; 289:1501-1504.

47. Rice DP, Rice R, Thesleff I. Fgfr mRNA isoforms in craniofacial bone development. *Bone* 2003; 33:14-27
48. Hollinger JO. Bone Dynamics: Morphogenesis, growth modeling and remodeling. En: Lieberman J, Friedlaender G (eds). *Bone Regeneration and Repair: Biology and Clinical Applications*. Totowa NJ: Humana Press, 1-20, 2005.
49. Xiao Y, Fu H, Prasad I, Yang YC, Hollinger JO. Gene expression profiling of bone marrow stromal cells from juvenile, adult, aged and osteoporotic rats: With an emphasis on osteoporosis. *Bone* 40:700-715, 2007
50. Einhorn T, Gerstenfeld LC. Fracture Healing: mechanisms and interventions. *Nature Reviews Rheumatology*. 2015; 11:45-54..
51. Carter DR, Beaupre GS, Giori NJ, et al. Mechanobiology of skeletal regeneration. *Clin Orthop*. 1998; S41-S55.
52. Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop*. 1998; S7-21.
53. Craft PD, Mani MM, Pazel J, et al. Experimental study of healing in fractures of membranous bone. *Plast Reconstr Surg*. 1974; 53:321-325.
54. Granstrom G, Nilsson LP: Experimental mandibular fracture: studies on bone repair and remodelling. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*. 1987 21:159-165.
55. Alberius P, Johnell O: Repair of intra-membranous bone fractures and defects in rats. Immunolocalization of bone and cartilage proteins and proteoglycans. *J Craniomaxillofac Surg*. 1991; 19:15-20.
56. Martin TJ, Sims NA. Osteoclast-derived activity in the coupling of bone formation to resorption. *Trends Mol Med*. 2005; 11:76-81.
57. Lorenzo J. Interactions between immune and bone cells: New insights with many remaining questions. *J Clin Invest*. 2000; 106:749-752.
58. Mashiba T, Hirano T, Turner CH, et al. Suppressed bone turnover by bisphosphonates increases microdamage accumulation and reduces some biomechanical properties in dog rib. *J Bone Miner Res*. 2000; 15:613-620.
59. Odvina CV, Zerwekh JE, Rao DS, et al. Severely suppressed bone turnover: A potential complication of Alendronate therapy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005; 3:1294-1301.
60. Parfitt AM. Targeted and non-targeted bone remodelling: Relationship to basic multicellular unit origination and progression. *Bone* 2002; 30:5-7.
61. Hazenberg JG, Freeley M, Foran E, et al. Microdamage: A cell transducing mechanism based on ruptured osteocyte processes. *J Biomech*. 2006; 39: 2096-2103
62. Parfitt AM. Skeletal heterogeneity and the purposes of bone remodeling: implications for the understanding of osteoporosis. In: Marcus R, Feldman D, Nelson DA, Rosen CJ, editors. *Osteoporosis*. 3rd ed. Amsterdam. Boston. Heidelberg. London. New York. Oxford. Paris. San Diego. San Francisco. Singapore. Sydney. Tokyo: Elsevier. 2008; 71-89.
63. Manolagas SC. Choreography from the tomb: An emerging role of dying osteocytes in the purposeful, and perhaps not so purposeful, targeting of bone remodeling. *BoneKey osteovision*. 2006; 3:5-14, 2006.

64. Mulcahy LE, Taylor D, Lee TC, Duffy GP. RANKL and OPG activity is regulated by injury size in networks of osteocyte-like cells. *Bone*. 2012; 48: 182–188
65. Kurata K, Heino TJ, Higaki H, Väänänen HK. Bone marrow cell differentiation induced by mechanically damaged osteocytes in 3D gel-embedded culture *J Bone Miner Res*. 2006; 21:616-625.
66. Martin RB: Toward a unifying theory of bone remodeling. 2000; *Bone* 26:1-6.
67. Lind M. Growth factors: possible new clinical tools. A review. *Acta Orthop Scand* 1996; 67: 407-417.
68. Lee K, Silva EA, Mooney DJ. Growth factor delivery-based tissue engineering: general approaches and a review of recent developments. *J R Soc Interface* 2011; 8:153-70.
69. Lind M. Growth factor stimulation of bone healing. Effects on osteoblasts, osteotomies, and implant fixation. *Acta Orthop Scand Suppl*. 1998;283: 2–37.
70. Schliephake H. Bone growth factors in maxillofacial skeletal reconstruction. *Int J Oral Maxillofac Surg* 5 :469-484, 2002.
71. Jilka RL, Noble B, Weinstein RS. Osteocyte apoptosis. 2013; *Bone* 54: 264–271
72. Strayhorn CL, Garrett JS, Runn RL, Benedict JJ, Somerman MJ. Growth factors regulate expression of osteoblast-associated genes. *J Periodontol* 1999; 70: 1345–1354.
73. Linkhart TA, Mohan S, Baylink DJ. Growth factors for bone growth and repair: IGF, TGF beta and BMP. *Bone* 1996; 19: 1S–12S.
74. Gao J, Symons AL, Bartold PM. Expression of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) in the developing periodontium of rats. *J Dent Res* 1998; 77:1708–1716.
75. Centrella M, Canalis E. Transforming and non transforming growth factors are present in medium conditioned by fetal rat calvariae. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 7335–7339.
76. Bottner M, Kriegelstein K, Unsicker K. The transforming growth factor beta: structure, signalling, and roles in nervous system development and functions. *J Neurochem* 2000; 75:2227– 2240.
77. Entchev EV, Schwabedissen A, Gonzalez-Gaitan M. Gradient formation of the TGF-beta homolog Dpp. *Cell*. 2000; 103:981–991.
78. Mehara BJ, Most D, Chang J, et al. Basic fibroblast growth factor and transforming growth factor beta-1 expression in the developing dura mater correlates with calvarial bone formation. *Plast Reconstr Surg*. 1999; 104: 435–444.
79. Roth DA, Gold LI, Han VK, McCarthy JG, Sung JJ, Wisoff JH, Longaker MT. Immunolocalization of transforming growth factor beta 1, beta 2, and beta 3 and insulin-like growth factor I in premature cranial suture fusion. *Plast Reconstr Surg* .1997; 99: 300–309.
80. Roth DA, Longaker MT, Mc Carthy JG, Rosen DM, McMullen HF, Levine JP, Sung J, Gold LI. Studies in cranial suture biology: Part I. Increased immunoreactivity for TGF-beta isoforms (beta 1, beta 2, and beta 3) during cranial suture fusion. *J Bone Miner Res*. 1997; 12:311–321.
81. Sagiroglu JS, Mehara BJ, Chau D, et al. . Analysis of TGF-beta production by fusing and nonfusing mouse cranial sutures in vivo. *Ann Plast Surg*. 1999; 42:496–501.

82. Kaplan FS, Shore EM. Bone morphogenetic proteins and C-FOS: early signals in endochondral bone formation. *Bone*. 1999; 19(Suppl.): 13S–21S.
83. Centrella M, McCarthy TL, Canalis E. Transforming growth factor- β is a bifunctional regulator of replication and collagen synthesis in osteoblast-enriched cell cultures from fetal rat bone. *J Biol Chem*. 1997; 262: 2869–2874.
84. Miyazono K. Positive and negative regulation of TGF β signalling. *J Cell Sci*. 2000; 113: 1101–1109.
85. Park JS, Kim JY, Cho Y, et al. Epidermal growth factor (EGF) antagonizes transforming growth factor (TGF)- β 1 induced collagen lattice contraction by human skin fibroblasts. *Biol Pharm Bull*. 2000; 23: 1517–1520.
86. Worapamorn W, Haase HR, Li H, Bartold PM. Growth factors and cytokines modulate expression of cell surface in human periodontal ligament cells. *J Cell Physiol*. 2001; 186: 448–456.
87. Van Waes C. Cell adhesion and regulatory molecules involved in tumor formation, hemostasis, and wound healing. *Head Neck*. 1995; 17: 140–147.
88. Bujia J. Effect of growth factors on cell proliferation and matrix synthesis in cultured human chondrocytes. *Laryngorhinootologie*. 1995; 74: 444–449.
89. Pierreux CE, Nicolaus FJ, Hill CS. Transforming growth factor beta independent shuttling of smad4 between the cytoplasm and nucleus. *Mol Cell Biol*. 2000; 20: 9041–9054.
90. Miyazono K, Ten Dijke P, Ichiho H, Heldin CH. Receptors for transforming growth factor- β . *Advan Immunol*. 1994; 55: 181–220.
91. Younai S, Venters G, Vu S, Nichter L, et al. Role of growth factors in scar contraction: an *in vitro* analysis. *Ann Plast Surg*. 1996; 36: 495–501.
92. Virolainen P, Elima K, Metsaranta M, et al. Incorporation of cortical bone allografts and autografts in rats: expression patterns of mRNAs for the TGF-betas. *Acta Orthop Scand*. 1998; 100: 537– 544.
93. Tatakis DN, Wikesjo UM, Razi SS, et al. Periodontal repair in dogs: effect of transforming growth factor-beta 1 on alveolar bone and cementum. *J Clin Periodontol*. 2000; 27: 698–704.
94. Meraw SJ, Reeve CM, Lohse CM, Sioussat TM. Treatment of periimplant defects with combination growth factor cement. *J Periodontol*. 2000; 71: 81–83.
95. Bosch C, Melsen B, Gibbons R, Vargervik K. Human recombinant transforming growth factor-beta 1 in healing of calvarial bone defects. *J Craniofac Surg*. 1996; 7: 300–310.
96. Yamamoto M, Tabata Y, Hing L, Miyamoto S, et al. Bone regeneration by transforming growth factor-beta 1 released from a biodegradable hydrogel. *J Controlled Release*. 2000; 64: 133–142.
97. Hong L, Tabata Y, Niyamoto S, et al. Promoted bone healing at a rabbit skull gap between autologous bone fragment and the surrounding intact bone with biodegradable microspheres containing transforming growth factor-beta 1. *Tissue Eng*. 2000; 6: 331–340.
98. Sherris DA, Murakami CS, Larrabee WF , Bruce AG. Mandibular reconstruction with transforming growth factor-beta 1. *Laryngoscope*. 1998;108: 368–372.

99. Zellin G, Beck S, Hardwick R, Lindhe A. Opposite effects of recombinant human transforming growth factor beta-1 on bone regeneration in vivo: effects of exclusion of periosteal cells by microporous membrane. *Bone*. 1998; 22: 613–620.
100. Duneas N, Crook J, Ripamonti U. Transforming growth factor-beta 1: Induction of bone morphogenetic protein genes expression during endochondral bone formation in the baboon and synergistic interaction with osteogenic protein-1. *Growth Factors*. 1998; 15: 259–277.
101. Smith RA. The effect on TGF-beta on osseointegration. *J Calif Dent Assoc*. 1995; 23: 49–53.
102. Wijesjo UM, Razi SS, Sigurdsson TJ, et al.. Periodontal repair in dogs: effect of recombinant human transforming growth factor-beta 1 on guided tissue regeneration. *J Clin Periodontol*. 1998; 25: 475–481.
103. Chen D, Zao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors*. 2004; 22:233–241
104. Cao X, Chen D. The BMP signaling and in vivo bone formation. *Gene*. 2005; 357:1-8.
105. Scheufler C, Sebald W, Hulsmeier M. Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7 Å resolution. *J Mol Biol*. 1999;287: 103–105.
106. Reddi AH. Bone morphogenetic proteins: a conventional approach to isolation of first mammalian morphogens. *Cytokine Growth Factor Rev*. 1997; 8: 11–20.
107. Reddi AH. Bone morphogenic proteins and skeletal development: the kidney bone connection. *Pediatr Nephrol*. 2000; 14: 598–601.
108. Gong Y, Krakow D, Marcellino J, et al. Heterozygous mutations in the gene encoding noggin affect human joint morphogenesis. *Nat Genet*. 1999; 21: 302–304.
109. Kameda T, Koike C, Saitoh K, Kuroiwa A, Iba H. Developmental patterning in chondrocytic cultures by morphogenic gradients: BMP induces expression of indian hedgehog and noggin. *Genes Cells*. 1999; 4: 175–184.
110. Drossopoulou G, Lewis KE, Sanz- Ezquerro JJ, et al.. A model for anteroposterior patterning of the vertebrate limb based on sequential long- and short range Shh signalling and BMP signalling. *Development*. 2000; 127: 1337–1348.
111. Sakou T, Onishi T, Yamamoto T, et al. Localization of Smads, the TGF-beta family intracellular signalling components during endochondral ossification. *J Bone Miner Res*. 1999; 14: 1145–1152.
112. Franceschi RT. The developmental control of osteoblast-specific gene expression: role of specific transcription factors and the extracellular matrix environment. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1999; 10: 40–57.
113. Gilbert L, He X, Farmer P, Boden S, et al. Inhibition of osteoblast differentiation by tumor necrosis factor-alpha. *Endocrinology*. 2000; 141: 3956–3964.
114. Yamaguchi A, Katagiri T, Igeda T, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblastic differentiation and inhibits myogenic differentiation in vitro. *J Cell Biol*. 1991; 113: 681–687.
115. Reddi AH. Cartilage derived morphogenetic proteins and cartilage morphogenesis. *Microsc Res Tech*. 1998; 43: 131–136.

116. H. Schliephake: Bone growth factors in maxillofacial skeletal reconstruction. *Int. J.Oral Maxillofac. Surg.* 2002; 31: 469–484.
117. Sandhu HS, Kanim LE, Kabo JM, et al. Effective doses of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in experimental spinal fusion. *Spine.* 1996; 21: 2115– 2122.
118. Shigenobu K, Kaneda K, Nagai N, Kuboki Y. Localization of bone morphogenetic protein-induced bone and cartilage formation on a new carrier: Fibrous collagen membrane. *Ann Chir Gynaecol Suppl.* 1993; 207: 85–90.
119. Kawai T, Miki A, Ohno Y, Umemura M, Kataoka H, Kurita S, Koie M, Jinde T, Hasegawa J, Urist MR. Osteoinductive activity of composites of bone morphogenetic protein and pure titanium. *Clin Orthop.* 1993;290: 296– 305.
120. Kawamura M, Urist MR. Induction of callus formation by implants of bone morphogenetic protein and associated bone matrix noncollagenous proteins. *Clin Orthop.* 1988; 236: 240– 248.
121. Bosch PJ. Animal studies of application of rhBMP-2 in maxillofacial reconstruction. *Bone.* 1996; 19: 83S–92S.
122. Yasko AW, Lane JM, Fellingner EJ, et al. The healing of segmental bone defects, induced by recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-2). *J Bone Joint Surg.* 1992; 74: 659–668
123. Cook SD, Baffes GC, Wolfe MW, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-7 induces healing in a canine long-bone segmental defect model. *Clin Orthop.* 1994; 301: 302– 311.
124. Winn SR, Uludag H, Hollinger JO. Carrier systems for bone morphogenetic proteins. *Clin Orthop.* 1999; 367(Suppl.): S95–106.
125. Riley EH, Lane JM, Urist MR, et al. Bone morphogenetic protein-2: biology and applications. *Clin Orthop.* 1996; 324: 39–46.
126. Higuchi T, Kinoshita A, Takahashi K, Oda S, Ishikawa I. Bone regeneration by recombinant human bone morphogenetic protein-2 in rat mandibular defects. An experimental model of defect filling. *J Periodontol.* 1999; 70: 1026–1031
127. Howard BK, Brown KR, Leach JL, Chang CH, Rosenthal DI. Osteoinduction using bone morphogenic protein in irradiated tissue. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1998; 124: 985– 988.
128. Luca L, Rougemont AL, Walpoth BH, Gurny R, Jordan O. The effects of carrier nature and pH on rhBMP-2 induced ectopic bone formation. *J Control Release* 147:38-44, 2010
129. Wildemann B, Lange K, Strobel C, Fassbender M, Willie B, Schmidmaier G. Local BMP-2 application can rescue the delayed osteotomy healing in a rat model. *Injury.* 2011; 42: 746- 752.
130. Jung JH, Yun JH, Um YJ, et al. . Bone formation of Escherichia coli expressed rhBMP-2 on absorbable collagen block in rat calvarial defects. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011; 111:298-305.

131. Groeneveld EHJ, Van der Bergh JPA, Holzmann P, et al. Histomorphometrical analysis of bone formed in human maxillary sinus floor elevations grafted with OP-1 device, demineralised bone matrix or autologous bone. *Clin Oral Impl Res.* 1999; 10: 499–509.
132. Harnisch O, Tatakis DN, Boskovic MM, Rohrer MD, Wilkesjö UM. Bone formation and reosseointegration in peri-implantitis defects following surgical implantation of rhBMP-2. *Int J Oral Maxillofac Impl.* 1997; 12: 604–610.
133. Ylinin X, Yingying S, Seiko M, et al. Collagen sponge functionalized with chimeric anti-BMP-2 monoclonal antibody mediates repair of critical-size mandibular continuity defects in a nonhuman primate model. *Biomed Res Int.* 2017;doi:10.1155/2017/8094152.
134. Bessho K, Carnes DL, Cavin R, Chen HY, Ong JL. BMP stimulation of bone response adjacent to titanium implants in vivo. *Clin Oral Impl Res.* 1999; 10: 212–218.
135. Cook SD, Salkeld SL, Rueger DC. Evaluation of recombinant human osteogenic protein-1 (rhOP-1) placed with dental implants in fresh extraction sites. *J Oral Implantol.* 1995; 21: 281–289.
136. Friedlaender GE, Perry CR, Cole JD, et al. Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial nonunions. *J Bone Joint Surg Am.* 2001; 83 Suppl 1(Pt 2):S151 -8.
137. Govender S, Csimma C, Genant HK, et al. BMP-2 Evaluation in Surgery for Tibial Trauma (BESTT) Study Group. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. *J Bone Joint Surg Am.* 2002; 84:2123 -34.
138. McKee MD, Schemitsch EH, Waddell JP, Kreder HJ, Stephen DJG, Leighton RK, et al. The effect of human recombinant bone morphogenetic protein (rhBMP-7) on the healing of open tibial shaft fractures: results of a multi-center, prospective, randomized clinical trial. In: *Proceedings of the 18th Annual Meeting of the Orthopaedic Trauma Association*; 2002 Oct 11-13; Toronto, Ontario, Canada, p 157-8.
139. Jung RE, Thoma DS, Hammerle CH. Assessment of the potential of growth factors for localized alveolar ridge augmentation: a systematic review. *J Clin Periodontol.* 2008; 35:255-81.
140. De Long WG, Einhorn TA, Koval K, et al. Bone Grafts and Bone Grafts Substitutes in Orthopaedic Trauma Surgery. A critical Analysis. *J Bone Joint Surg.* 2007; 89:649-658.
141. Garrison KR, Shemilt I, Donell S, Ryder JJ, Mugford M, Harvey I, Song F, Alt V. Bone morphogenetic protein (BMP) for fracture healing in adults. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010; 16:CD006950.
142. Ripamonti U, Crooks J, Rueger DC. Induction of bone formation by recombinant human osteogenic protein-1 and sintered porous hydroxyapatite in adult primates. *Plast Reconstr Surg.* 2001; 107:977-988.
143. Gosain AK, Song L, Riordan P, et al. A 1-year study of osteoinduction in hydroxyapatite-derived biomaterials in an adult sheep model: part I. *Plast Reconstr Surg.* 2002; 109:619-630.

144. Fisher DM, Wong JM, Crowley C, Khan W. Preclinical and clinical studies on the use of growth factors for bone repair: A systematic review. *Curr stem Cell Res & Therapy*. 2013; 8:260-268.
145. Ripamonti U. Smart biomaterials with intrinsic osteoinductivity: Geometric control of bone differentiation, en *Bone Engineering*. Davies J.E. (ed). 1ª edición. Toronto. Ed em squared, 2000, pp 215-222
146. Gruskin E, Doll BA, Futrell FW, Schmitz JP, Hollinger JO. Demineralized bone matrix in bone repair: history and use. *Avd Drug Deliv Rev*. 2012; 64:1063,77.
147. Ripamonti U, Duarte R, Ferretti C. Re-evaluating the induction of bone formation in primates. *Biomaterials*. 2014; 35:9407-9422.
148. J.J.V. Meek'ren, *Observationes medico-chirurgicae, Observationes medico-chirurgicae*, In: HT Bloom, Amsterdam, 1632, p. 6.
149. Senn N. On the healing of aseptic bone cavities by implantation of antiseptic decalcified bone. *Ant J Med Sci (New series)*. 1889; 98:219.
150. Miller Ag: A case of bone grafting with decalcified bone chips. Remarks. *Lancet* II: 1890;618.
151. Bier A. Osteoplastische nekrotomie nebst bemerkungen uber die and der kieler chirurgischen klinick ausgerfuhrten methoden der nekrotomie. *Arch Klin Chir*. 1892; 43:121.
152. Leriche R. Policard A. Some fundamental principles in the pathology of bone. *Surg Ginecol Obstet*. 1926; September 56-87.
153. Groves EW. Methods and results of transplantation of bone in the repair of defects, *Br J Surg*. 1917; 5:185.
154. Phemister DB. The fate of transplanted bone and regenerative power of its various constituents, *Surg. Gynecol. Obstet*. 1914; 19: 303.
155. Martín-Lagos F, Zarapico M. Obtención experimental de hueso heterotópico. *Rev Esp Cir Traum Ortop*. 1946; 4:150:161.
156. Ray RD, Holloway JA. Bone implants. *J Bone Joint Surg*. 1957; 39-A: 1119-1126.
157. Urist MR. Bone formation by autoinduction. *Science*. 1965; 150:893-899.
158. Urist MR, Silverman BF, Buring K, Dubuc PL, Rosenberg JM: The bone induction principle. *Clin Orthop*. 1967; 53:243.
159. Urist MR, Strates BS. Mechanisms of growth and development bone morphogenetic protein. *J Dent Res*. 1971; 50:1392-1398.
160. Wang EA, Rosen V, Cordes P, et al. Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors. *Proc Nat Acad Sci USA*. 1988; 85:9484-9489.
161. Ozkaynat G, Ruegen DC, Dier GA, et al. OP 1 c DNA encodes an osteogenic protein in the TGF- β family. *EMBO J*. 1990; 9: 2085-93.
162. Nilsson OS, Bauer HCF, Brosjö O, Törnkqvist H. A comparison of indomethacin and diclofenac in the inhibition of experimental heterotopic new bone formation. *Int Orthop*. 1987;II:283-287
163. Itoman M, Nakamua S. Experimental study on allogenic bone grafts. *Int Orthop* 1991;15:161-165.

164. Goel SC, Tuli SM, Singh HP, et al. Allogenic decalbone in the repair of benign cystic lesions of bone. *Int Orthop*. 1992; 16:176-179.
165. Munting E, Wilmar J-F, Wijne A, Hennebert P, Delloye CH. Effect of sterilization on osteoinduction. *Acta Orthop Scand*. 1988;59:34-38.
166. Han B, Tang B, Nimni M. Quantitative and sensitive in vitro assay for osteoinductive activity of demineralized bone matrix. *J Orthop Res*. 2003; 21:648–654.
167. Sigholm G, Gendler E, Mckellop H, et al. Graft perforations favor osteoinduction - Studies of rabbit cortical grafts sterilized with ethylene oxide. *Acta Orthop Scand* 1992;63:177-182
168. Dziedzic-Goclawska A, Ostrowski K, Stachowicz W, et al. Effect of radiation sterilization on the osteoinductive properties and the rate of remodeling of bone implants preserved by lyophilization and deep-freezing. *Clin Orthop*. 1992;72:30-37.
169. Wang JC, Alanay A, Mark D, et al. A comparison of commercially available demineralized bone matrix for spinal fusion. *Eur Spine J*. 2007;16: 1233–1240.
170. Lomas RJ, Gillan HL, Matthews JB, et al. An evaluation of the capacity of differently prepared demineralised bone matrices (DBM) and toxic residuals of ethylene oxide (EtOx) to provoke an inflammatory response in vitro. *Biomaterials*. 2001; 22:913–921.
171. Bae H, Zhao L, Zhu D, et al. Variability across ten production lots of a single demineralized bone matrix product. *J Bone Joint AM*. 2010; 92:427.435.
172. Becerra J, Andrades JA, Ertl DC, et al. Demineralized bone matrix mediates differentiation of bone marrow stromal cells in vitro: effect of age of cell donor. *J Bone Miner Res*. 1996; 11:1703–1714.
173. Nishimoto SK, Chang CK, Gendler E, et al. The effect of aging on bone formation in rats: biochemical and histological evidence for decreased bone formation capacity. *Calcif Tissue Int*. 1996; 37:617–624
174. Traianedes K, Russell JL, Edwards JT, et al. Donor age and gender effects on osteoinductivity of demineralized bone matrix. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2004; 70:21–29
175. Wildemann B, Kadow-Romacker A, Hass NP, Schidmaier G. Quantification of various growth factors in different demineralized bone matrix preparations. *J Biomed Mater Res A*. 2007; 81:437-42.
176. Hass HJ, Krause H, Kroker S, Wagemann W, Meyer F. Bone formation using human demineralised bone matrix (Grafton) for the treatment of bone cysts in children. *Eur J Pediatr Surg*. 2007; 17:45-9.
177. Rosenthal RK, Folkman J, Glowacki J. Demineralized bone implants for nonunion fractures, bone cysts and fibrous lesions. *Clin Orthop Relat Res*. 1999; 364:61-9.
178. Tiedeman JJ, Garvin KL, Kile TA, Connolly JF. The role of a composite, demineralized bone matrix and bone marrow in the treatment of osseous defects. *Orthopedics*. 1995;18:1153-8.
179. Mulliken JB, Glowacki J, Kaban LB, Folkman J, Murray JE. Use of demineralized allogeneic bone implants for the correction of maxillocraniofacial deformities. *Ann Surg*. 1981;194:366-72.

180. Schwartz Z, Goldstein M, Raviv E, et al. Clinical evaluation of demineralized bone allograft in a hyaluronic acid carrier for sinus lift augmentation in humans: a computed tomography and histomorphometric study. *Clin Oral Implant Res.* 2007; 18:204-211.
181. Lee S, Jang JH, Kim KS, et al. Failure of bone regeneration after demineralized bone matrix allograft in human maxillary sinus floor elevation. *Basic Appl Pathol.* 2009; 2:125-130.
182. Katz JM, Ntaraj C, Jaw R, et al. Demineralized bone matrix as an osteoinductive biomaterial and in vitro predictors of its biological potential. *J Biomed Mater Res B appl Biomater.* 2009; 89:127-134.
183. Fassbender M, Minkwitz S, Thiele M, et al. Efficacy of two different demineralized bone matrix grafts to promote bone healing in a critical-size-defect: a radiological, histological and histomorphometric study in rat femurs. *Int orthop.* 2014; 38:1963-1969.
184. Irinakis T. Efficacy of injectable demineralized bone matrix as graft material during sinus elevation surgery with simultaneous implant placement in the posterior maxilla: clinical evaluation of 49 sinuses. *J Oral Maxillofac Surg.* 2010; 69:134-41.
185. Gertzman A, Sunwoo MH. A pilot study evaluating sodium hyaluronate as a carrier for freeze-dried demineralized bone powder. *Cell and Tissue Banking.* 2001; 2: S87-S94.
186. Li H, Zou X, Woo C, Ding M, Lind M, Büniger C. Experimental anterior lumbar interbody fusion with an osteoinductive bovine bone collagen extract. *Spine* 2005;30:890-6
187. Walboomers XF, Jansen JA. Tissue induction, using a COLLOSS-filled titanium fibre meshscaffolding material. *Biomaterials.* 2005;26:4779-85
188. Arias J, López-Arcas JM, González T, Gómez E, Morán MJ. Utilización de Colloss® para el tratamiento de quistes mandibulares. *Rev Esp Cirug Oral y Maxilofac.* 2007; 29:1-11.
189. Ruhaimi KA. Bone graft substitutes: a comparative qualitative histologic review of current osteoconductive grafting materials. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2001; 16:105-114.
190. Parikh SN. Bone graft substitutes in modern orthopedics. *Orthopedics.* 2002; 25:1301-1309.
191. Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials.* 2005; 26:5474-5491.
192. Enneking WF, Campanacci DA. Retrieved human allografts: a clinicopathological study. *J Bone Joint Surg Am.* 2001;83:971-86.
193. Boyce T, Edwards J, Scarborough N. Allograft bone. The influence of processing on safety and performance. *Orthop Clin North Am.* 1999;30:571-81.
194. Enneking WF, Mindell ER. Observations on massive retrieved human allografts. *J Bone Joint Surg Am.* 1991;73:1123-42.
195. Hofer S, Leopold SS, Jacobs J. Clinical perspectives on the use of bone graft based on allografts. In: Laurencin CT, editor. *Bone graft substitutes.* West Conshohocken, PA: ASTM International. 2003; 68-95.
196. Bucholz RW. Nonallograft osteoconductive bone graft substitutes. *Clin Orthop.* 2002; 395:44-52.
197. Kelly CM, Wilkins RM, Gitelis S, Hartjen C, Watson JT, Kim PT. The use of a surgical grade calcium sulfate as a bone graft substitute: results of a multicenter trial. *Clin Orthop.* 2001;

- 382: 42-50.
198. Gitelis S. Use of calcium sulfate-based bone graft substitute for benign bone lesions. *Orthopedics* 2001; 24: 244-258.
 199. Taylor JC, Cuff SE, Leger JP, et al. In vitro osteoclast resorption of bone substitute biomaterials used for implant site augmentation: a pilot study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2002; 17:321-330.
 200. Benke D, Olah A, Mohler H. Protein-chemical analysis of Bio-Oss bone substitute and evidence on its carbonate content. *Biomaterials.* 2001; 22:1005-1012.
 201. Schmitt JM, Buck DC, Joh SP, et al. Comparison of porous bone mineral and biologically active glass in critical-sized defects. *J Periodontol.* 1997; 68:1043-1053.
 202. Schlegel KA, Fichtner G, Schultze M, et al. Histologic findings in sinus augmentation with autogenous bone chips versus a bovine bone substitute. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2003; 18:53-58.
 203. Park JW, Jang JH, Bae SR, et al. Bone formation with various bone graft substitutes in critical-sized calvarial defect. *Clin Oral Implant Res.* 2009; 20:372-378.
 204. Kim RW, Kim JH, Moon SY. Effect of hydroxiapatite on critical-sized defect. *Maxillofac Plast Reconstr Surg.* 2016; 38:26-32.
 205. Slotte C, Lundgren D, Burgos PM. Placement of autogeneic bone chips or bovine bone mineral in guided bone augmentation: a rabbit skull study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2003; 18:795-806, 2003
 206. Berglundh T, Lindhe J. Healing around implants placed in bone defects treated with Bio-Oss. An experimental study in the dog. *Clin.Oral Implants Res.* 1997. 8:117-124.
 207. Terheyden H, Jepsen S, Moller B, et al. Sinus floor augmentation with simultaneous placement of dental implants using a combination of deproteinized bone xenografts and recombinant human osteogenic protein-1. A histometric study in miniature pigs. *Clin Oral Implants Res.* 1999; 10:510-521.
 208. Mooney MP, Siegel M. Animal models for bone tissue engineering of critical-sized defects (CSDs), bone pathologies and orthopedic disease states. In: Hollinger JO, Einhorn TA, Doll BA, Sfeir C, eds. *Bone Tissue Engineering.* Boca Raton, London, New York and Washington, DC: CRC Press, pp 217-244, 2005.
 209. Muschler GF, Vivek P, Raut MS, Patterson TE, Wenke JC, Hollinger JO. The design and use of Animal Models for Translational Research in Bone Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Tissue Engineering: Part B.* 2010; 1:123-147.
 210. Hollinger JO, Kleinschmidt JC. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J Craniofac Surg.* 1990; 1:60-68.
 211. Bosch C, Melsen B, Vargervik K. Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials. *J Craniofac.Surg.* 1998; 9:310-316.
 212. Cooper GM, Mooney MP, Gosain AK, et al. Testing the critical size in calvarial bone defects: revisiting the concept of a critical-size defect. *Plast Reconstr Surg.* 2010; 125:1685-92.
 213. ASTM Standard F2721, 2008. Standard Guide for Preclinical In Vivo Evaluation in Critical

- Size Segmental Bone Defects. West Conshohocken, PA: ASTM International, 2003.
214. Muschler GF, Raut VP, Patterson JC, et al. The design and use of animal models for translational research in bone tissue engineering and regenerative medicine. *Tissue Eng Part B Rev.* 2010; 16: 123-145.
 215. Concannon MJ, Boschert MT, Puckett CL: Bone induction using demineralized bone in the rabbit femur: a long-term study. *Plast Reconstr Surg.* 1997; 99:1983-1988.
 216. Schmitz JP, Schwartz Z, Hollinger JO, et al. Characterization of rat calvarial nonunion defects. *Acta Anat.(Basel).* 1990; 138:185-192.
 217. Chakkalakal DA, Strates BS, Mashoof AA, et al. Repair of segmental bone defects in the rat: an experimental model of human fracture healing. *Bone.* 1999; 25:321-332.
 218. Wang RU, Rabie A. A quantitative assessment of the healing of intramembranous and endochondral autogenous bone grafts. *Er J Orthod.* 1999; 21:119-126.
 219. Por YC, Barcelo CR, Salyer KE, et al. Bone generation in the reconstruction of a critical size calvarial defect in an experimental model. *J Craniofac Surg.* 2008; 19, 383-393.
 220. Gupta DM, Kwan MD, Slater BJ, Wan DC, Longaker MT. Applications of an athymic nude mouse model of nonhealing critical-sized calvarial defects. *J Craniofac Surg.* 2008; 19: 192-201.
 221. Develioglul H, Unver Saraydin S, Kartal U. The bone-healing effect of a xenograft in a rat calvarial defect model. *Dent Mater J.* 2009; 28, 396-400.
 222. Dahlin C, Alberius P, Linde A. Osteopromotion for cranioplasty. An experimental study in rats using a membrane technique. *J Neurosurg.* 1991; 74:487-491.
 223. Yoon E, Dhar S, Chun DE, et al. In vivo osteogenic potential of human adiposederived stem cells=poly lactide-co-glycolic acid constructs for bone regeneration in a rat critical-sized calvarial defect model. *Tissue Eng.* 2007; 13: 619-627.
 224. Lin L, Shen Q, Wei X, et al. Comparison of osteogenic potentials of BMP transduced stem cells from autologous bone marrow an fat tissue in a rabbit model of calvarial defects. *Calcif Tissue Int.* 2009; 85: 55-65.
 225. Itagaki T, Honma T, Takahashi I, et al. Quantitative analysis and localization of mRNA transcripts of type I collagen, osteocalcin, MMP 2, MMP 8, and MMP 13 during bone healing in a rat calvarial experimental defect model. *Anat Rec (Hoboken).* 2008; 291:1038-1043.
 226. Vajgel A, MArdas N, Farias BC, et al. A systematic review of the critical size defect model. *Clin Oral Implants Res.* 2014; 25:879-883.
 227. Dempster DW, Compston M, Drezner K, et al. Standardized nomenclature, symbols and units for bone hystomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry nomenclature comittee. *J Bone Min Res.* 2013;28:2-17.
 228. Holy CE, Fialkov JA, Schoichet MS, et al: In vivo models for bone tissue-engineering constructs, en *Bone Engineering*, Davies J.E. (ed). 1ª edición. Toronto. Ed em squared incorporated, 2000
 229. Glaser J, Greene G, Hendricks S. *Stereology for Biological Research. With a Focus on Neuroscience.* Williston: MBF Press, 2007.

230. Mouton PR. Principles and Practice of Unbiased Stereology. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2002.
231. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, et al. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbol and units. *J Bone Miner Res* 1987;2:595-610.
232. Merz WA, Schenk RK. Quantitative structural analysis of human cancellous bone. *Acta Anat* 1970;75:54-66.
233. Velásquez-Forero FM. Histomorfometría de la biopsia previo marcaje y procesada sin descalcificar. *Patología*. 2009; 47:108-117.
234. Gundersen HJ, Tensen ES. The efficiency of systematic sampling in stereology and its predictors. *J Microsc*. 1987; 147:229-263.
235. Manadrim-De-Lacerda C. *Anna Academ Bras Cienc*. 2008; 75:469-486.
236. Cruz O. Precision of Cavalieri sections and slices with local errors. *J Microsc*. 1999; 193: 182-198.
237. García-Fiñana M, Cruz O. Fractional trend of the variance in cavalieri sampling. *Image Anal Stereol*. 2000; 19:71-79.
238. Arias Gallo J. Factor fibroblástico en regeneración ósea. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid, 2004.
239. Comparative, Histological and Histomorphometric analysis of three anorganic bovine xenogenous bone substitutes: Bio-Oss, Bone-Fill and Gen-Ox Anorganic. *J Maxillofac Oral Surg*. 2014; 13:464-470.
240. Bissinger O. Micro-CT vs whole body multirow detector CT for analysing bone regeneration in an animal model. *PloS ONE*. 2016; 11:e0166540.
241. Ritman E. Current Status of Developments and Applications of Micro-CT. *Ann Rev Biomed Engin*. 2011; 13:531-52.
242. Annibali S, Bellavia D, Ottolenghi L, et al. Micro-CT and PET analysis of bone regeneration induced by biodegradable scaffolds as carriers for dental pulp stem cells in a rat model of calvarial “critical size” defect. Preliminary data. *J Biomed Mat Res B: Appl Biomater*. 2014; 4:815-825.
243. Gans SI, Taylor TT, Tee BC. Comparison of Micro-CT and CBCT in Determining Tissue Mineral Density. *Proceedings of the American Society of Orthodontics Congress*. San Francisco 2011. 0166.
244. Arai Y, Tammisalo E, Iwai K et al. Development of a compact tomographic apparatus for dental use. *Dentomaxillofac Radiology*. 1999; 28:245-248.
245. Mozzo P, Procacci C, Tacconi A , et al. A new volumetric CT machine for dental imaging based on the cone-beam technique: preliminary results. *European Radiology*. 1999; 8:1558-64.
246. Tyndall DA, Rathore S. Cone-Beam CT Diagnostic applications: Caries, periodontal bone assessment, and endodontic applications. *Dent Clin North Am*. 2008; 52:825-841.
247. Hashimoto K, Kawashima S, Kameoka S et al. Comparison of image validity between cone beam computed tomography for dental use and multidetector row helical computed tomography. *Dentomaxillofac Radiol*. 2007;36:465-71.

248. Hashimoto K, Kawashima S, Araki M, et al. Comparison of image performance between cone-beam computed tomography for dental use and four row multidetectorhelical CT. *J Oral Sci.* 2006; 48:27-34.
249. Farman AG , Field of view. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009; 108: 477-8.
250. Pauwels R, Jacobs R, Singen SR, et al. CBCT-based bone quality assessment: are Hounsfield units aaplicable? *Dentomaxillofac Radiol.* 2015; 44: doi 20140238.
251. Campos MJ, De Souza TS, Mata SL, et al. Bone mineral density in cone beam computed tomography: Only a few shades of grey. *World J Radiol.* 2014;6:607-612.
252. Do Gyoon Kim. Can dental Cone Beam computed tomography assess bone mineral density?. *J Bone Metab.* 2014; 21:117-126.
253. Nardi C, Talamandi C, Pallete S, et al. Head and neck effective dose and quantitative assessment of image quality. A study to compare cone Beam CT and multislice Spiral CT. *Dentomaxillofac Radiol.* 2017; 16: 20170030.
254. Kamaregiu K, Ese G, Akgü C, et al. Effect of voxel size on accuracy of cone beam tomography-aided assessment of periodontal furcation involvement. *Oral Surg Oral Med Oral PAtHol Oral radiol.* 2015; 120:644-650.
255. Hsu ST, Nang SP, Hiang HL, et al. The assessment of trabecular bone parameters and cortical bone strength: a comparison of micro-ct and dental cone-beam CT. *J Biomed.* 2013; 46:2611-2618.
256. Ludlow JB, Davies- Ludlow LE, Brooks SL, Howerton WB. Dosimetry of 3 CBCT devices for oral and maxillofacial radiology: CB Mercuray, NewTom 3G and i-CAT. *Dentomaxillofac Radiol.* 2006;35:219-26.
257. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, et al. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res.* 2010; 25: 1468-86.
258. Bauer JS, link TM, Burghardt A, Henning TD, Mueller D, Majumdar S, et al. Analysis of trabecular bon estructure with multidetector spiral computed tomography in a simulated soft tissue enviroment. *Clacif Tissue Int.* 2007; 80:366-373.
259. Taschereau R, Chow PL, Chatziioannou AF. Montecarlo simulations of dose from microCT imaging procedures in a realsitic mouse phantom. *Med Phys.* 2006; 33:216-24.
260. Klinck RJ, Campbell GM, Boyd SK. Radiation effects on bone architecture in mice and rats resulting from in vivo micro-computed tomography scanning. *Med Eng Phys.* 2008; 30: 888-95.
261. O'Loughlin PF, Morr S, Bgnovic et al. Selection and development of preclinical models in fracture healing research. *J Bone Joint Surg Am.* 90:79-84.
262. Histing T, García P, Holstein JH, Klein M, Matthys R, Nuetzi R, et al. Small animal bone healing models: standards, tips, and pitfalls, results of a consensus meeting. *Bone.* 2011; 49:591-9.
263. Park JW, Bae SR, Suh JY , et al. Evaluation of bone healing with eggshell-derived bone graft

- substitutes in rat calvaria: a pilot study. *J Biomed Mater Res A*. 2008;87:203-14.
264. Carragee EJ, Hurwitz EL, Weiner BK. A critical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 trials in spinal surgery: emerging safety concerns and lessons learned. *Spine J*. 2011; 11:471-91.
 265. Hinsenkamp M, Collard JF. Growth factors in orthopaedic surgery: demineralized bone matrix versus recombinant bone morphogenetic proteins. *Int Orthop*. 2015;39:137-47.
 266. Simmonds MC, Browns JVE, Heirs M, et al. Safety and effectiveness of recombinant human bone morphogenetic protein-2 for spinal fusion. A meta-analysis of individual participant data. *Ann Intern Med*. 2013; 158:877-889.
 267. Nienhuijs ME, Walboomers XF, Briest A, et al. Healing of bone defects in the goat mandible, using Colloss-E and beta-tricalciumphosphate. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2010;92:517-24.
 268. Jensen J, Foldager CB, Jakobsen TV. Use of carboxymethyl cellulose and collagen carrier with equine bone lyophilisate suggests late onset bone regenerative effect in a humerus drill defect-a pilot study in six sheep. *Open Orthop J*. 2010;4:181-7.
 269. Hockers T, Abensur D, Valentini P, et al. The combined use of bioresorbable membranes and xenografts or autografts in the treatment of bone defects around implants. A study in beagle dogs. *Clin.Oral Implants Res*. 1999; 10:487-498.
 270. Young C, Sandstedt P, Skoglund A. A comparative study of anorganic xenogenic bone and autogenous bone implants for bone regeneration in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1999; 14:72-76.
 271. Su-Gwan K, Hak-Kyun K, Sung-Chul L. Combined implantation of particulate dentine, plaster of Paris, and a bone xenograft (Bio-Oss) for bone regeneration in rats. *J Craniomaxillofac Surg*. 2001; 29:282-288.
 272. Hockers T, Abensur D, Valentini P, et al. The combined use of bioresorbable membranes and xenografts or autografts in the treatment of bone defects around implants. A study in beagle dogs. *Clin.Oral Implants Res*. 1999; 10:487-498.
 273. Park JW, Jang JH, Bae SR, et al. Bone formation with various bone graft substitutes in critical-sized calvarial defect. *Clin Oral Implant Res*. 2009; 20:372-8.
 274. Kim RW, Kim JH, Moon SY. Effect of hydroxiapatite on critical-sized defect. *Maxillofac Plast Reconstr Surg*. 2016;38:26-32.
 275. Klinge B, Alberius P, Isaksson S, et al: Osseous response to implanted natural bone mineral and synthetic hydroxylapatite ceramic in the repair of experimental skull bone defects. *J Oral Maxillofac Surg*. 1992; 50:241-249.
 276. Woodward JR, Hildore AJ, Lan SK, et al. The mechanical properties and osteoconductivity of hydroxiapatite bone scaffolds with multi-scale porosity. *Biomaterials*. 2007;28:45-54.
 277. Lee S, Jang JH, Kim KS, et al. Failure of bone regeneration after demineralized bone matrix allograft in human maxillary sinus floor elevation. *Basic Appl Pathol*. 2009;2:125-130.
 278. Wu J, Li B, Lin X. Histological outcomes of sinus augmentation for dental implants with calcium phosphate or deproteinized bovine bone: a systematic review and meta-analysis. *Int*

- J Oral Maxillofac Surg. 2016; 45:1471-1477.**
- 279. Jensen T, Schou S, Stavropoulos A. Maxillary sinus floor augmentation with Bio-Oss or Bio-Oss mixed with autogenous bone as a graft: a systematic review. Clin Oral Implant res. 2012; 23:263-73.**
 - 280. Maciel J, Momesso GA, Ramalho-Ferreira G. Bone healing evaluation in critical-size defects treated with xenogenous bone plus porcine collagen. Implant Dent. 2017;26:296-302.**
 - 281. Kim Y, Nowzari H, Rich SK. Risk of prion disease transmission through bovine-derived bone substitutes: a systematic review. Clin Implant Detan Rela Res. 2013;15:645-63.**
 - 282. Omran M, Min S, Abdelhamid A, et al. Alveolar ridge dimensional changes following ridge preservation procedure: part-2- CBCT analysis in non-human primate model. Clin Oral Impant Res. 2016;27:859-66.**
 - 283. Min S, Liu J, Tang L, et al. Alveolar ridge dimensional changes following ridge preservation procedure: part-1- CBCT linear analysis in non-human primate model. Clin Oral Impant Res. 2016;27:97-105.**
 - 284. Cavezian R, Pasquet G. Cone Beam computerized tomography and implants. Rev Stomatol Chir Maxillofac. 2012; 113: 245-58.**
 - 285. EbinaH, hatakeyama J, Onodera M, Honna T, kamakura S, Shimauchi H, et al. Micro-CT analysis of alveolar bone healing using a rat experimental model of critical-size defects. Oral Dis, 2009; 15: 273-80.**
 - 286. Nazarian A, Snyder BD, Zurakowski D, et al. Quantitative micro-computed tomography: a non-invasive method to assess equivalent bone mineral density. Bone. 2008; 43:302-311.**
 - 287. Pallesen L, Schou S, Aaboe M, et al: Influence of particle size of autogenous bone grafts on the early stages of bone regeneration: a histologic and stereologic study in rabbit calvarium. Int J Oral Maxillofac Implants 17:498-506,**
 - 288. Thomsen JS, Laib A, koller B, Proshaska S, Mosekilde L, Gowin W. Stereological measures of trabecular bon estructure: comparison of 3D micro computed tomography with 2D histological sections in human proximal tibial bone biopsies. J Microsc. 2005; 218: 171-179.**
 - 289. Muller R, Van Campenhout H, Van Damme B, et al. Morphometric analysis of human bone biopsies: a quantitative structural comparison of histological sections and micro-computed tomography. Bone. 1998; 23:59-66.**